CHARAKTERISIERUNG DER INVERSIONSSTELLE DES INVERTIERBAREN SEGMENTS DES BAKTERIOPHAGEN MU

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

ROBERT SCHMUCKER
aus Elsenfeld
1986

Charakterisierung der Inversionsstelle des invertierbaren Segments des Bakteriophagen Mu

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von

Robert Schmucker

aus Elsenfeld

1986

Tag der mündlichen Prüfung : 5.September 1986

Dekan: Professor Dr.R.Hampp

1.Berichterstatter: Professor Dr.V.Braun
2.Berichterstatter: Professor Dr.K.Hantke

für Matthias

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1984 bis August 1986 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Dr. D.Kamp durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielen hilfreichen Gespräche und die großzügige Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Dr.D.Kamp herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.V.Braun und Herrn Prof.Dr.K.Hantke, die die Arbeit vor der Fakultät vertraten.

Für die Synthese der Oligodeoxynukleotide möchte ich mich bei Herrn Prof.Dr.Oesterhelt bedanken.

Für viele nützliche Anregungen und Diskussionen habe ich meinen Kollegen Beate Stern und Wolfgang Ritthaler zu danken

Für technische Hilfe bin ich Frau Marianne von Gruber, Frau Maria Köberlein, Frau Renate Koch und Frau Gaby Sowa zu Dank verpflichtet.

1. Zusammenfassung 1

2. Einleitung 2

3. Problemstellung 18

4. Material und Methoden 19

4.1 Allgemeine Chemikalien und Enzyme 19

4.2 Medien und Puffer 20

4.3 Bakterienstämme und Bakteriophagen 22

4.4 Plasmide 22

4.5 Konstruktion von lysogenen Bakterienstämmen 23

4.6 Herstellung und Titerbestimmung von Phagenlysaten 25

4.7 Quantitativer Gin-Test 26

4.8 Phagen-DNA Präparation 26

4.9 Synthese, Reinigung und Klonierung von Oligodeoxynukleotiden 28

4.9.1 Synthese und Reinigung 28
4.9.2 Charakterisierung der Oligodeoxynukleotide 29
4.9.3 Klonierung der Oligodeoxynukleotide 30

4.10 Isolierung von DNA Fragmenten 31

4.11 Ligierung von DNA-Fragmenten 31

4.12 Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA 32

4.13 Schnelle Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly 33

4.14 Plasmidpräparation nach Stougaard und Molin 34

4.15 Restriktionsenzymanalyse von DNA 35

4.15.1 Restriktionsendonuklease-Verdau 35
4.15.2 Agarose Plattengel-Elektrophorese 36
4.15.3 Größenberechnung der Restriktionsfragmente 37

4.16 Konstruktion von Plasmiden 37

4.16.1 Konstruktion der pIR Plasmide 37
4.16.2 Konstruktion der pGS Plasmide 39
4.16.3 Konstruktion der pBS Plasmide 40

4.17 Sequenzspezifische Mutagenese 45

4.17.1 Partielle Verdaus 45
4.17.2 Ligation, Transformation und Selektion 45
4.17.3 Nomenklatur 47
4.17.4 Charakterisierung der Mutanten 47

4.18 Kreuzung der Mutanten in Mu 54

4.18.1 Kreuzung von Mutanten mit Antibiotikamarker 54
4.18.2 Kreuzung von Mutanten ohne Antibiotikamarker 54

4.19 Inversionstest 55

4.19.1 Inversion in den pMU901-Derivaten (pIR-Plasmide) 55
4.19.2 Inversion in den galK-Plasmiden 55
4.19.3 Inversion in Phagenmutanten der β-Region 56
4.19.4 Inversion in Phagenmutanten des G-Segments 56

5. Resultate 57

5.1 Eingrenzung der Inversions-Stelle 57

5.1.1 Subklonierung von α-IR-G(L) Fragmenten 58
5.1.2 Rekombination eines verkürzten IRs 63
5.1.3 Inversion in subklonierten G-Segmenten 70
5.1.4 Inversion in Substitutionsmutanten der β-Region 74
5.1.5 Inversion in Substitutionsmutanten des G-Segments 77

5.2 Charakterisierung der stimulierenden Sequenzen in 82

5.2.1 Inversion in Insertionsmutanten in 82
5.2.2 Inversion von G(-) nach G(+) 84
5.2.3 Dosiseffekt 85
5.2.4 Heterologe Komplementierung 86
5.2.5 Stimulierung der Inversion durch Sequenzen der β-Region 87

6. Diskussion 102

7. Literatur 115

1. Zusammenfassung

Die sequenzspezifische Rekombinationsfunktion Gin katalysiert die Inversion des G Segments im Bakteriophagen Mu, wodurch der Wirtsbereich des Phagen erweitert wird. Das invertierbare Segment wird von gegenläufigen Sequenzwiederholungen ('inverted repeats', 'IRs') flankiert, innerhalb derer das Crossing over erfolgt, das zur Inversion des G Segments führt.

Die Gesamtheit der DNA Sequenzen, die zu einer effizienten Inversion notwendig sind, wurde als Inversionsstelle definiert. Es konnte gezeigt werden, daß sie aus zwei Komponenten besteht.

Die IRs stellen den essentiellen Teil der Inversionsstelle dar. Durch Klonierung eines Oligodeoxynukleotids, das die IR Sequenz enthielt, konnte gezeigt werden, daß der IR unabhängig von den ihn im invertierbaren Segment umgebenden Sequenzen effizient rekombinieren kann. Dagegen konnte mit der halben IR Sequenz keine Inversion nachgewiesen werden, obwohl die Crossing over Stelle enthalten war.

Als zweite Komponente der Inversionsstelle konnte in der angrenzenden β -Region ein Enhancer Element identifiziert werden, das die Inversion des G Segments stimulierte. Es lag innerhalb eines 210bp großen DNA Segments, das vom IR durch die Insertion eines 1200bp Fragments getrennt und das auch invertiert werden konnte, ohne seine Aktivität zu verlieren (Schmucker et al., 1986).

2. Einleitung

Das Genom des Bakteriophagen Mu verleiht dem Phagen hinsichtlich seiner unspezifischen Integration ins Wirtsgenom, seiner replikativen Transpositionsvorgänge bei der lytischen Vermehrung und des Vorhandenseins eines invertierbaren Segments Eigenschaften, die ihn von anderen Phagen unterscheiden.

Nach der Injektion des Phagengenoms kommt es in einem ersten replikativen Transpositionsschritt zu einer unspezifischen Integration des Phagengenoms ins Bakteriengenom. Diese bewirkt eine Mutationsrate von 3% (Taylor, 1963), wenn sich diese Phagenkopie als Prophage manifestiert. Diese Eigenschaft hat dem Phagen auch seinen Namen gegeben (Mutator). Der lysogene Zustand wird durch die Synthese des Repressors cI erreicht, der die Expression der meisten viralen Funktionen unterbindet.

Im Gegensatz zu den restlichen Genen des Mu Genoms wird cI vom Gegenstrang (l Strang) abgelesen (Giphart-Gassler und van de Putte, 1979; van Meeteren et al., 1980). Es wird angenommen, daß die Synthese des Repressors auf mindestens drei Wegen kontrolliert wird: erstens durch Autoregulation (van de Putte et al., 1980a), zweitens durch negative Regulation durch ner (van Leerdam et al., 1982) und drittens Stimulierung durch cimI und cimII (van de Putte et al., 1980a).

Im lytischen Zyklus erfolgt die Vermehrung der Phagen DNA

über mehrere replikative Transpositionsereignisse, wofür die Genprodukte A und B des Bakteriophagen verantwortlich sind. Dabei werden die Kopien der Phagen DNA über das gesamte Bakteriengenom verteilt. A katalysiert die Replikation und die Transposition und entspricht damit den Transposasen der Transposons, während B nur eine stimulierende Wirkung auf A ausübt (O'Day et al., 1978). In mehrerlei Hinsicht läßt sich eine verwandtschaftliche Beziehung zu den Transposons der Tn3 Familie herstellen. Wenn Mu DNA ins Wirtsgenom integriert, entstehen an der Integrationsstelle 5bp Duplikationen (Kahmann und Kamp, 1979), die auch bei der Transposition der Transposons der Tn3 Familie gefunden wurden (Rosenberg et al., 1979). Die transponierbaren Elemente unterscheiden sich von Mu allerdings darin, daß sie 40bp lange fast identische gegenläufige Sequenzwiederholungen ('inverted repeats') besitzen, die in Mu nicht vorhanden sind. Jedoch finden sich die äußeren 31bp des c Endes von Mu aufgeteilt in den äußeren 20bp des S Endes und den Positionen 79-92 vom S Ende aus wieder (Kahmann und Kamp, 1979). Weiterhin besteht eine teilweise Homologie zwischen tnpR (Resolvase), einem Genprodukt von Tn3, das die Auflösung der bei der Transposition entstehenden Cointegrate katalysiert, und der sequenzspezifischen Rekombinationsfunktion gin, das die Inversion des G Segments katalysiert. Experimentell gelingt die Aufspaltung in Phagenverhalten und Transposonverhalten durch Konstruktion von Mini-Mus. Sie tragen große interne Deletionen, die in vitro (Schumann und Bade, 1979) oder in vivo (Faelen et al., 1978) erzeugt sein

können, und besitzen nur noch die Enden von Mu und manchmal eines oder mehrere frühe Gene. Die kleinsten bisher gefundenen Mini-Mus, die nach Komplementation durch Mu transponieren können, besitzen 1000bp am c Ende und 116bp des S Endes.

Nach der replikativen Transpositionsphase beginnt die Reifung der Phagenpartikel. Die Phagengenome werden von den Phagenköpfen ausgeschnitten und verpackt. Der Verpackungsvorgang verläuft ausgehend vom c Ende zum S Ende, wobei die Verpackung erst abgeschlossen ist, wenn der Phagenkopf voll ist. Da der Phagenkopf ca.39kb aufnehmen kann, das Mu-Genom aber nur 37,5kb lang ist, werden am S Ende ca. 1,5kb Bakteriengenom mitverpackt (Bukhari und Taylor, 1975). Auch das c Ende weist kein definiertes Ende auf. Es muß nach einem Mechanismus entstehen, in dem die Doppelhelixstruktur eine Rolle spielt, da die Länge dieses variablen Endes mit dem Vielfachen von 11bp variiert (George und Bukhari, 1981). Schließlich wird die Bakterienzelle lysiert und entläßt 50-100 Phagenpartikel. Ein neuer Zyklus der Infektion beginnt mit der Anheftung der Schwanzfasern an den Rezeptoren der Bakterienzelle.

Das G Segment, das die Schwanzfasern des Bakteriophagen Mu expremiert, wurde bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen entdeckt. Nach Denaturierung und Renaturierung von Mu DNA fand man Heteroduplexmoleküle, die eine Schleife ausbildeten (Hsu und Davidson, 1974). Es stellte sich heraus, daß in den Heteroduplex Molekülen Einzelstränge mit verschieden orientierten G Segmenten miteinander hybridisiert

hatten. Die nicht komplementären Bereiche bildeten daher eine Schleife aus. Ein zweiter, nicht komplementärer Bereich, der allerdings auch in den Homoduplex Molekülen gefunden wurde, war das 'Split End' (SE) (Daniell et al., 1973). Es stellte den Anteil an Bakterien DNA dar, der beim Verpacken mit in den Phagenkopf gelangt war. Da die Phagenmoleküle aus verschiedenen Bereichen des Bakteriengenoms stammten, war die Sequenz in diesem Teil des renaturierten Doppelstrangs ebenfalls nicht komplementär.

Bei der Suche nach der Funktion des G-Segments konnte eine Beziehung zum Wirtsbereich des Phagen hergestellt werden. Nur die Phagen, die das G-Segment in einer bestimmten Orientierung vorliegen hatten, waren in der Lage E.coli K12 zu infizieren (Bukhari und Ambrosio, 1978). Es konnten Phagen konstruiert werden, die das G-Segment in jeweils einer Orientierung eingefroren hatten - G(+) bzw. G(-) -, und es konte nachgewiesen werden, daß nur Phagen mit der G(+) Orientierung in der Lage waren, E.coli K12 zu infizieren (Kamp et al., 1978). Es wurden noch weitere Stämme gefunden, die sensitiv waren für G(+) Phagen. Dazu gehörten Salmonella typhimurium und Arizona. Ebenso wurden Stämme gefunden, die nur von G(-) Phagen infiziert werden können: E.coli C, Citrobacter freundii, Shigella sonneii, Enterobacter cloacae und einige Erwinia Stämme (van de Putte et al., 1980; Kamp 1981; Faelen et al., 1981a, b). Die Mu Gene S und U sind für die Spezifität des Wirtsbereichs verantwortlich (Toussaint et al., 1978). Howe et al. (1979) zeigten, daß die Gene S und U im G-Segment kartieren.

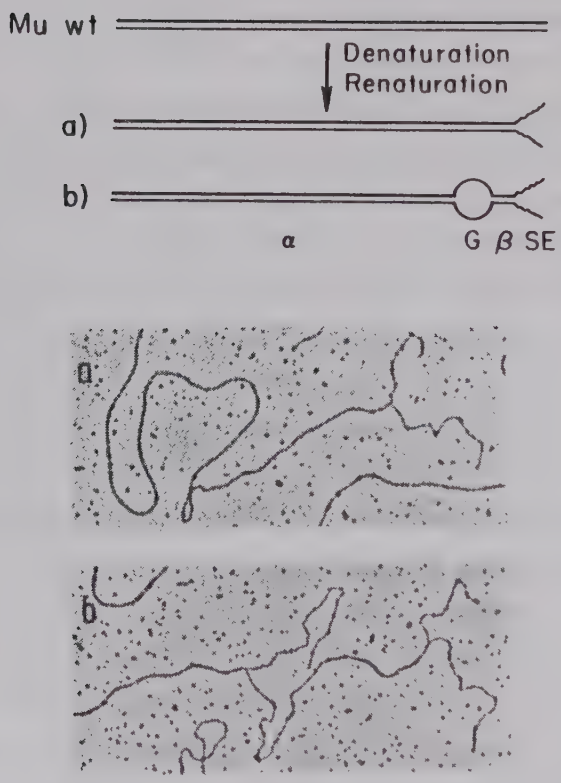


Bild Nr.1: Entstehung von Heteroduplex Molekülen

Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme der DNA Strukturen, die nach Denaturierung und Renaturierung von Mu DNA beobachtet wurden; die verschiedenen Segmente wurden als α-Region, G-Segment, β-Region und 'Split End' (SE) bezeichnet.

Die Sequenzierung des G-Segments und der angrenzenden Bereiche von α und β ergab, daß die Gene S und U bzw. S' und U' punktsymmetrisch innerhalb des G-Segments angeordnet sind. Der Promotor und das Startcodon für S liegen außerhalb des G-Segments in der α-Region, so daß der Amino-Terminus von S durch die Inversion nicht verändert wird (S_c). Der carboxyterminale Bereich von S (S_v bzw. S_v') schließt sich im linken Teil des G-Segments an. Die Gene U und U' liegen im Innern des G-Segments und werden entsprechend der Orientierung des G-Segments expremiert (Kamp und Kahmann, nicht publiziert).

Die Inversion des G-Segments erfolgt durch die sequenzspezifische Rekombinationsfunktion Gin, die neben dem G Segment in der β-Region expremiert wird (Daniell et al., 1973; Hsu und Davidson, 1974; Kamp et al., 1978).

Bei der sequenzspezifischen Rekombination erfolgt ein Crossing over durch eine sequenzspezifische Trennungs- und Ligierungsreaktion zwischen zwei kurzen homologen DNA Segmenten. Die dabei verursachten Veränderungen in der DNA hängen davon ab, ob die beiden homologen Abschnitte auf verschiedenen DNA Molekülen oder auf dem gleichen DNA Molekül liegen.

Bei der intermolekularen Reaktion integriert ein Replikon in ein anderes Replikon. Das am besten untersuchte sequenzspezifische Rekombinationssystem, bei dem eine intermolekulare Reaktion stattfindet, stellt das Integrations- und Excisions- System des Phagen Lambda dar (Herskowitz und Hagen, 1980; Nash, 1981). Die Integration des Bakteriophagen Lambda

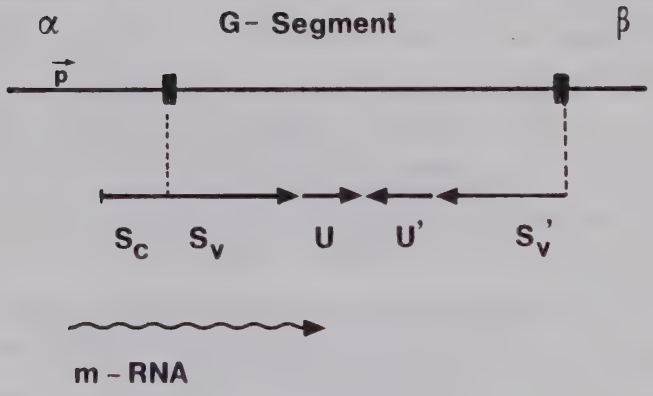


Bild Nr.2: Lage der Schwanzfasergene im G-Segment

erfolgt durch eine sequenzspezifische Rekombination zwischen den Anheftungsstellen des Bakteriophagen (attP, POP') und des Bakteriums (attB, BOB'). Das Crossing over erfolgt innerhalb einer 15bp langen Region (O-Bereich, 'core region'), die in den Anheftungsstellen des Phagen und des Bakteriums identisch sind. Es entstehen zwei Prophagenanheftungsstellen, die die linken (attL, BOP') und die rechten (attR, POB') Verbindungsstellen zwischen der bakteriellen DNA und dem integrierten Prophagen darstellen. Beim rückläufigen Vorgang erfolgt die Rekombination zwischen attL und attR, was zur Excision des Prophagen aus dem Wirtsgenom führt. Der Phage übt die Kontrolle über die Richtung der Rekombination aus, indem er entweder Int alleine expremiert, was zur Integration der Phagen DNA führt, oder Int und Xis gleichzeitig, was zur Excision des Prophagen führt. Die beiden Anheftungsstellen des Phagen und des Bakteriums haben ein unterschiedliches Aussehen. attB besteht aus einer 23bp langen Sequenz, die die 15bp lange 'core-region' (Mizuuchi und Mizuuchi, 1985) und zwei Int-Bindungsstellen (Ross und Landy, 1982) beinhaltet. attP besteht dagegen aus einem 240bp langen DNA Segment, in dem Bindungsstellen für mehrere Proteine liegen, die am Integrations- und Excisionsprozess teilnehmen. Mittels Nuclease 'footprinting' Experimenten wurden sieben Int Bindungsstellen gefunden. Ein Sequenzvergleich dieser Bindungsstellen läßt den Schluß zu, daß Int zwei verschiedene Sequenztypen erkennen kann, was wahrscheinlich durch die Benutzung von zwei verschiedenen Erkennungsdomainen auf dem Protein ermöglicht wird. Dadurch

ergibt sich eine Aufteilung der Int Bindungsstellen in 'arm-type' Bindungsstellen, von denen je eine auf P1 und P2 und drei auf P' (P'1, 2, 3) vorkommen und zwei 'junction type' Bindungsstellen (C und C'), die die 'core region' flankieren. Vom letzteren Typ sind auch die beiden Int Bindungsstellen auf attB (Hsu et al., 1980; Ross und Landy, 1982). Darüberhinaus wurden noch drei Bindungsstellen für IHF gefunden (H1, H2 und H'), das die Int Wirkung stimuliert (Craig und Nash, 1984). Es wurden auch zwei Bindungsstellen für Xis (X1 und X2) gefunden (Yin et al., 1985).

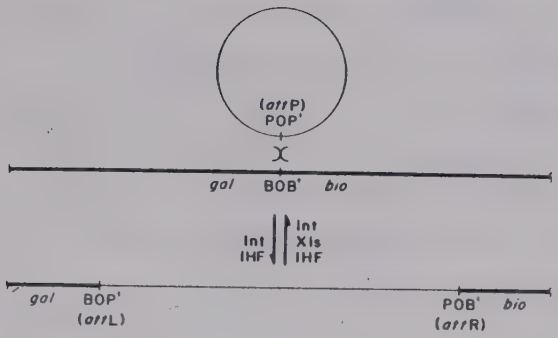
Bei der intramolekularen Reaktion hängt die Art der DNA Veränderung von der Orientierung der beiden homologen DNA Segmente ab. Bei gleicher Orientierung kommt es zur Deletion des zwischen den DNA Segmenten liegenden Bereichs. Ein Beispiel für diese Art von sequenzspezifischer Rekombination stellt die Auflösung des Cointegrats bei Tn3 dar (Grindley, 1983; Heffron, 1983). Die Transposition des Transposons Tn3 und der mit ihm verwandten Transposons erfolgt durch einen 2-stufigen Rekombinationsmechanismus (Gill et al., 1978).

Bild Nr.3: a. Integration und Excision des Bakteriophagen Lambda
Der dünn ausgezogene Kreis stellt die zirkularisierte Lambda DNA, die dick ausgezogene Linie die Bakterien DNA dar (aus M.Better, S.Wickner, J.Auerbach und H.Echols. (1983) Cell **32**, 161-168).

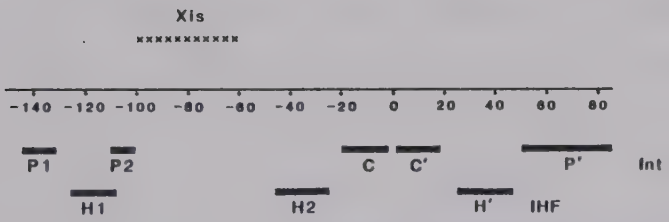
Bild Nr.3: b. Bindungsstellen für Int, IHF und Xis auf attP

Die Mitte der 'core-region' wurde mit Null bezeichnet; die durch Int und IHF geschützten Bereiche wurden durch Balken, die durch Xis geschützten Bereiche durch Kreuze gekennzeichnet (aus Yin et al., 1985).

a


(attP)
POP'
gal
BOB'
bio
Int
IHF
Int
Xis
IHF
gal
BOP'
(attL)
POB'
(attR)
bio

b

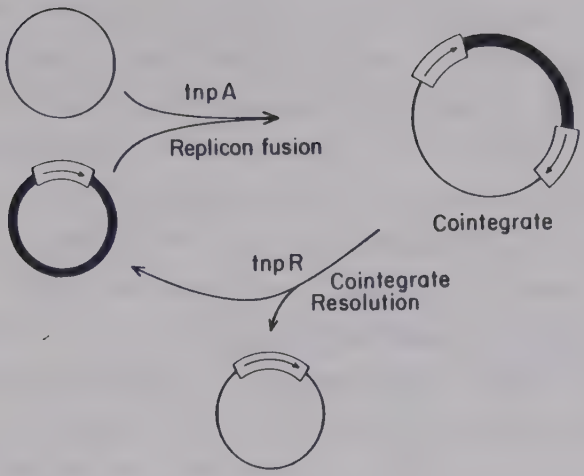

Xis
-140
-120
-100
-80
-60
-40
-20
0
20
40
60
80
P1
P2
C
C'
P'
Int
H1
H2
H'
IHF

Zunächst wird in einer tnpA abhängigen Reaktion das Transposon in einer replikativen Transposition auf ein anderes Replikon übertragen, wobei Donor- und Acceptorreplikon miteinander zum Cointegrat fusionieren. Letzteres wird in einem Resolvase (tnpR) abhängigen Schritt in einer intramolekularen sequenzspezifischen Rekombination auseinandergebrochen. Bei diesem Vorgang werden die beiden Replikons wieder getrennt, wobei nun beide das Transposon besitzen. Das DNA Segment, das zur Auflösung des Cointegrats notwendig ist, wird als 'resolution site' ('res-site') bezeichnet. Es hat eine Länge von 115bp (Wells und Grindley, 1984) und enthält 3 Bindungsstellen für die Resolvase, wobei eine Bindungsstelle eine 19bp Sequenz enthält ('internal resolution site','IRS'), innerhalb derer das Crossing over passiert (Kostriken et al., 1981). Die Resolvase schneidet innerhalb dieses Fragments in der palindromischen Sequenz 5' TTAT$^{\downarrow}$AA 3' und bildet dabei einen Überhang von zwei Basen am 3'-Ende (Reed und Grindley, 1981). Ein Vergleich der DNA Sequenzen der Bindungsstellen zeigt, daß jede von ihnen aus invertierten Kopien einer konservierten Sequenz von 9bp besteht, die durch einen variablen Linker von 7 bis 16bp voneinander getrennt sind.

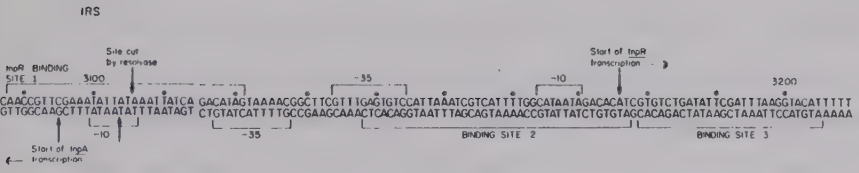
Bild Nr.4: a. Bildung und Auflösung des Cointegrats bei Tn3 (aus N.D.F.Grindley, 1983)

Bild Nr.4: b. Sequenz der res Stelle und Lage der Bindungsstellen für die Resolvase (aus F.Heffron, 1983)

a


tnpA
Replicon fusion
Cointegrate
tnpR
Cointegrate
Resolution

b


IRS
tnpR BINDING
SITE 1
3100
Site cut
By resolvase
-35
-10
Start of tnpR
transcription
3200
GCAACCGTTCGAAATATTATAAATTATCA GACATAGTAAAACGGCTTCGTTTGAGTGTCCATTAAATCGTCATTTTGGCATAATAGACACATCGTGTCTGATATTCGATTTAAGGTACATTTTT
CGTTGGCAAGCTTTATAATATTTAATAGT CTGTATCATTTTGCCGAAGCAAACTCACAGGTAATTTAGCAGTAAAACCGTATTATCTGTGTAGCACAGACTATAAGCTAAATTCCATGTAAAAA
-10
-35
BINDING SITE 2
BINDING SITE 3
Start of tnpA
transcription

Bei einer intramolekularen Reaktion, bei der die homologen DNA Segmente in antiparalleler Orientierung vorliegen, kommt es zur Inversion des von ihnen eingeschlossenen DNA Segments. Im Falle dieser Inversionssysteme werden die homologen DNA Segmente als gegenläufige Sequenzwiederholungen ('inverted repeats', 'IRs') bezeichnet. Die invertierbaren Segmente sind nicht nur auf Bakteriophagen beschränkt, sondern finden sich z.B. auch bei bei dem Bakterium Salmonella typhimurium (Silverman und Simon, 1983). Die abwechselde Expression der Flagellenantigene H1 und H2 (Phasenvariation) wird durch die Inversion eines 995bp großen Segments (H-Segment) reguliert. Das Hin Protein codiert innerhalb des invertierbaren Segments und katalysiert die sequenzspezifische Rekombination zwischen 14bp langen IRs an den Enden des H-Segments. Durch die Inversion des H-Segments wird der Promotor für das H2 Gen gekoppelt oder entkoppelt. Ist der Promotor an das H2 Gen gekoppelt, werden sowohl das H2 Gen als auch ein Repressor für das H1 Gen (rH1) transcribiert, der die Expression von H1 blockiert. Da dieser in der entkoppelten Orientierung nicht mehr vorhanden ist, wird in diesem Fall H1 expremiert.
Komplementationsstudien ergaben funktionelle Homologien zwischen den invertierbaren Systemen. Der dem Phagen Mu sehr ähnliche Phage D108 und die nicht verwandten Phagen P1 und P7, die ebenfalls ein DNA Segment (C Segment) besitzen, in dem die Schwanzfasern dieser Phagen expremiert werden und das durch eine sequenzspezifische Rekombinationsfunktion Cin invertiert wird (Lee et al., 1974; Yun & Vapnek, 1977),

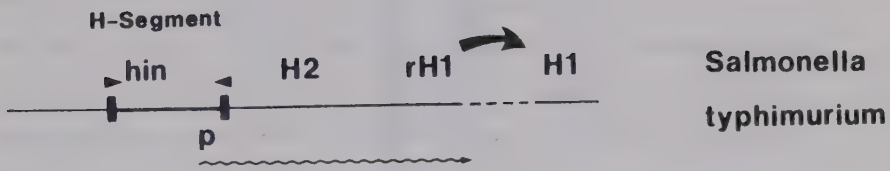


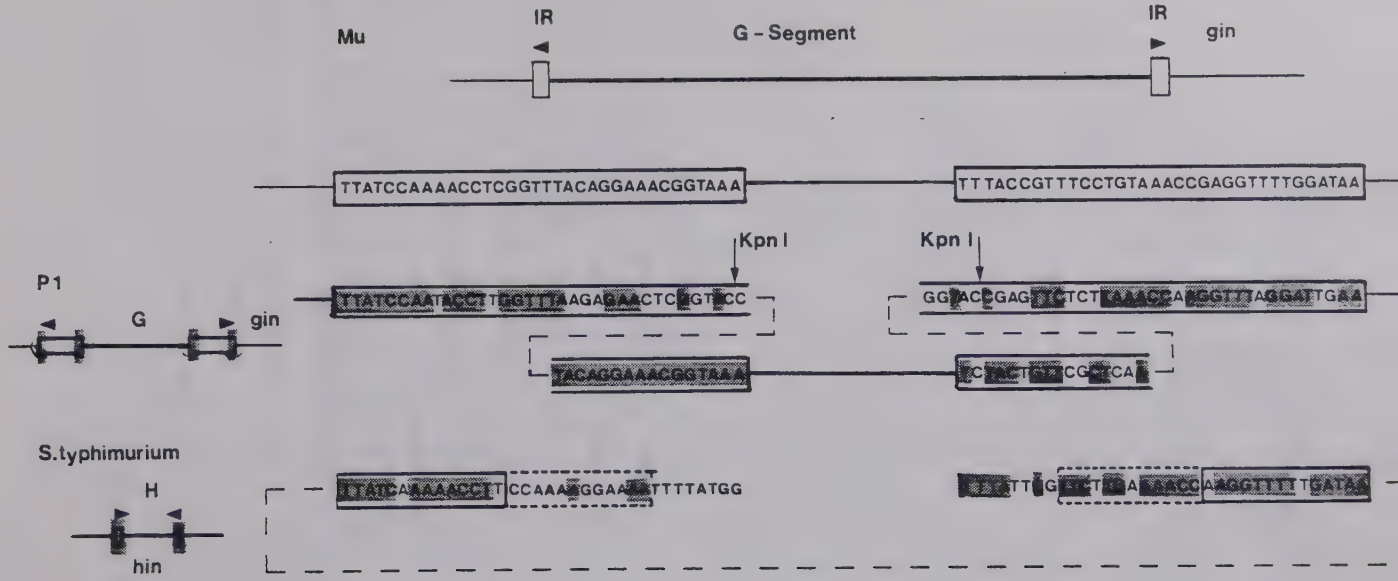
Bild Nr.5: Inversion des H-Segments in S.typhimurium

waren in der Lage den Phagen Mu-445-5, bei dem gin deletiert war, zu komplementieren (Kamp et al., 1979). Die Inversionsfunktion hin des Bakteriums Salmonella typhimurium war ebenfalls in der Lage Mu-445-5 zu komplementieren (Kamp und Kahmann, 1981). Umgekehrt war gin in der Lage einen cin defekten Phagen Pl zu komplementieren (Kahmann et al., nicht publiziert) und ein hin-defektes H-Segment in S.typhimurium wieder zu invertieren (Kutsukake et al., 1980).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Rekombinationsfunktionen Gin, Cin und Hin zeigten eine 60%ige Homologie. Die funktionelle Ähnlichkeit der miteinander komplementierbaren Inversionssysteme spiegelt sich auch in homologen Abschnitten der unterschiedlich langen IRs wider. Die IRs des Bakteriophagen Mu sind 34bp lang. Die IRs des hin Systems sind 14bp lang, wobei allerdings zusätzlich die in Nachbarschaft liegenden 12bp zur Inversion benötigt werden (Johnson und Simon, 1985), während die IRs des C Segments des Bakteriophagen Pl 640bp besitzen, wobei der zur Inversion notwendige Teil auf die äußeren 36bp eingegrenzt werden konnte (Iida et al., 1982). Ein Sequenzvergleich zeigt, daß die Sequenz der funktionellen Anteile der IRs weitgehend konserviert ist.

Bild Nr.6: Sequenzvergleich der IRs der Rekombinationssysteme von Mu, Pl und S.typhimurium

Die schraffierten Bereiche stellen konservierte Sequenzen dar; die im hin System zusätzlich zum IR benötigten Sequenzen befinden sich im gestrichelten Kasten.


Mu
IR
G - Segment
IR
gin
TTATCCAAAACCTCGGTTTACAGGAAACGGTAAA
TTTACCGTTTCCTGTAAACCGAGGTTTTGGATAA
Kpn I
Kpn I
P1
G
gin
S.typhimurium
H
hin

3. Problemstellung

Die in allen Inversionssystemen konservierte Sequenz der IRs deutete darauf hin, daß sie einen wesentlichen Bestandteil der zur Inversion benötigten Sequenzen darstellt. Innerhalb der IRs konnte die Crossing over Region näher eingegrenzt werden (Schmucker, 1984). Eine weitergehende Analyse sollte alle Erkennungssequenzen liefern, die zu einer effizienten Inversion des G Segments benötigt werden. Dadurch sollte eine Einordnung der Inversionssysteme in die anderen Gruppen der sequenzspezifischen Rekombinationssysteme möglich sein, deren Prototypen die Integration und Excision des Bakteriophagen Lambda und die Cointegrat Auflösung bei Tn3 darstellen.

4. Material und Methoden

4.1 Allgemeine Chemikalien und Enzyme

Verwendete Chemikalien

Acrylamid (Biorad, Richmond USA)
Äthanol, absolut zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (Serva, Heidelberg)
Agarose Type II (Sigma, München)
Ammoniumchlorid zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Borsäure (Sigma, München)
5-Bromo-4-chloro-indolyl-ß-D-galaktosid,
(Serva, Heidelberg)
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
Caesiumchlorid (Baker Chemicals, Deventer NL)
Calciumchlorid (Merck, Darmstadt)
Chloroform zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Dichloro-dimethyl-silan (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
Dimethylformamid (Baker Chemicals, Deventer NL)
Dithiothreit (Merck, Darmstadt)
Eisen-(III)-chlorid zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Essigsäure zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg)
Glucose (Merck, Darmstadt)
Glycerin (etwa 87%) zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Harnstoff (Biorad, Richmond USA)
8-Hydroxychinolin zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Isopropylthiogalaktosid, (Serva, Heidelberg)
Kalium-di-hydrogen-phosphat zur Analyse
(Merck, Darmstadt)
Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt)
Magnesiumsulfat zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Mercaptoäthanol (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
Natriumacetat zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat, SDS (Serva, Heidelberg)
di-Natriumhydrogenphosphat zur Analyse
(Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid-Plätzchen zur Analyse
(Merck, Darmstadt)
N,N'-Methylene-bis-acrylamid (Biorad, Richmond USA)
N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylen-diamin (Biorad,
Richmond USA)
Phenol zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Polyäthylenglykol 6000 (Serva, Heidelberg)
Propanol-2 zur Analyse (Merck, Darmstadt)
Saccharose (Merck, Darmstadt)
Silan GF31 (Wacker, München)
Tetrachlorkohlenstoff (Merck, Darmstadt)
Thiamin-Hydrochlorid (Sigma, München)

Titriplex III, EDTA (Merck, Darmstadt)
Tri-ethyl-amin (Merck, Darmstadt)
Triton-X 100 (Serva, Heidelberg)
Trizma Base (Sigma, München)
Trizma HCl (Sigma, München)
Xylencyanol FF (Serva, Heidelberg)

Verwendete Enzyme

Lysozym (Boehringer, Mannheim)
DNase I (Sigma, München)
RNase A (Sigma, München)
T_4-DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim)
Polynukleotidkinase (Boehringer, Mannheim)
Restriktionsendonukleasen: AccI, AhaIII, BamHI, BclI, BglII, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HindII, HindIII, HpaII, KpnI, PstI, Sau3AI, SspI, TaqI, XhoII (Boehringer, Mannhein)
HinPI, Sau96 (BioLabs)

4.2 Medien und Puffer

Verwendete Ausgangsprodukte
Bacto Agar (Difco, Detroit)
Bacto Trypton (Difco, Detroit)
Gelatine (Merck, Darmstadt)
Hefeextrakt (Difco, Detroit)
MacConkey Agar Base (Difco, Detroit)
Nutrient Broth (Difco, Detroit)
Vitamin Assay Casamino Acids (Difco, Detroit)

Die Ausgangsprodukte wurden gemäß den Vorschriften zusammengegeben und autoklaviert (20min, 120°C).

YT-Medium (dYT-Medium)

8g (16g) Bacto Trypton
5g (10g) Hefeextrakt
5g NaCl
ad 1000 ml aqua dest.

YT - Platten

YT-Medium, zusätzlich 15 g Bacto Agar

Antibiotika - Platten

wie YT-Platten, jedoch zusätzlich Antibiotika in folgenden Konzentrationen:

Ampicillin: 20mg/l
Kanamycin: 20mg/l
Tetracyclin: 20mg/l

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen

angefertigt, die steril filtriert wurden.

MacConkey Gal Platten

40gr MacConkey Agar Base
add 1000ml
nach dem Autoklavieren Zugabe von 50ml 20% Galaktose

NA - Weichagar

8g Nutrient Broth
5g NaCl
6,5 g Bacto Agar
ad 1000 ml aqua dest.

10 x M9-Puffer

70g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
30g KH_2PO_4
10g NH_4Cl
ad 1000 ml aqua dest.

M9CAA - Medium

100ml 10xM9-Puffer
900ml aqua dest.
5g Vitamin Assay Casamino Acids
nach dem Autoklavieren Zugabe von:
1ml Vitamin B1 (Stammlösung 2mg/ml)
1ml $MgCl_2$ (1M)
25ml 20% Glucose (w/v)

SM - Puffer

20ml 25% NaCl (w/v)
1ml $MgSO_4$ (1M)
20ml Tris-HCl (1M), pH7,5 (25^oC)
ad 1000 ml aqua dest.
Nach dem Autoklavieren Zugabe von:
10ml 1% Gelatinelösung (w/v)

TM - Puffer

10ml Tris-HCl (1M), pH7,5 (25^oC)
10ml $MgSO_4$ (1M)
ad 1000ml aqua dest.

100 x TE - Puffer

0,1M EDTA pH8,0 (25^oC)
1M Tris-HCl pH8,0 (25^oC)

4.3 Bakterienstämme und Bakteriophagen

Die Bakterienkulturen wurden in YT- oder dYT-Medium bei 32°C (lysogene Stämme) oder 37°C gezogen. 2,5ml einer frischen Übernachtkultur wurden mit 1ml Glycerin (80%) versetzt und bei -15°C gelagert.

CSH50: F^-, ara^-, lac^-, pro^-, Str^-, Bl^- (Miller, 1972)

CSH50(Mu cIts62) (Chow et al., 1977)

DK947: CSH50(Mu cIts62 gin^-445-5 G(-)) (Kamp et al., 1978)

C600: F^-, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ^- (Appleyard, 1954)

RR1: F^-, hsdS20 (r^-_B, m^-_B, ara14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ^- (Bolivar et al., 1977)

GM33: F^-, dam3 (Marinus & Morris, 1974)

S1652: F^-, Sm^r, trägt große Deletion im gal Operon (Saedler & Starlinger)

N100: $recA^-$, $galK^-$ (McKennedy et al., 1981)

Enterobacter cloacae (Hartmann & Göbel, 1977)

Bei allen E.coli Stämmen handelt es sich um E.coli K12 Derivate.

4.4 Plasmide

pBR 322	Bolivar et al. (1977)
pUC 7, 8, 9	Vieira und Messing (1982)
pUC-4K	Vieira und Messing (1982)
pGK 1800	McKennedy et al. (1981)

Zur Komplementierung von $\underline{gin}^-$ Mutanten wurden folgende

Plasmide benutzt:

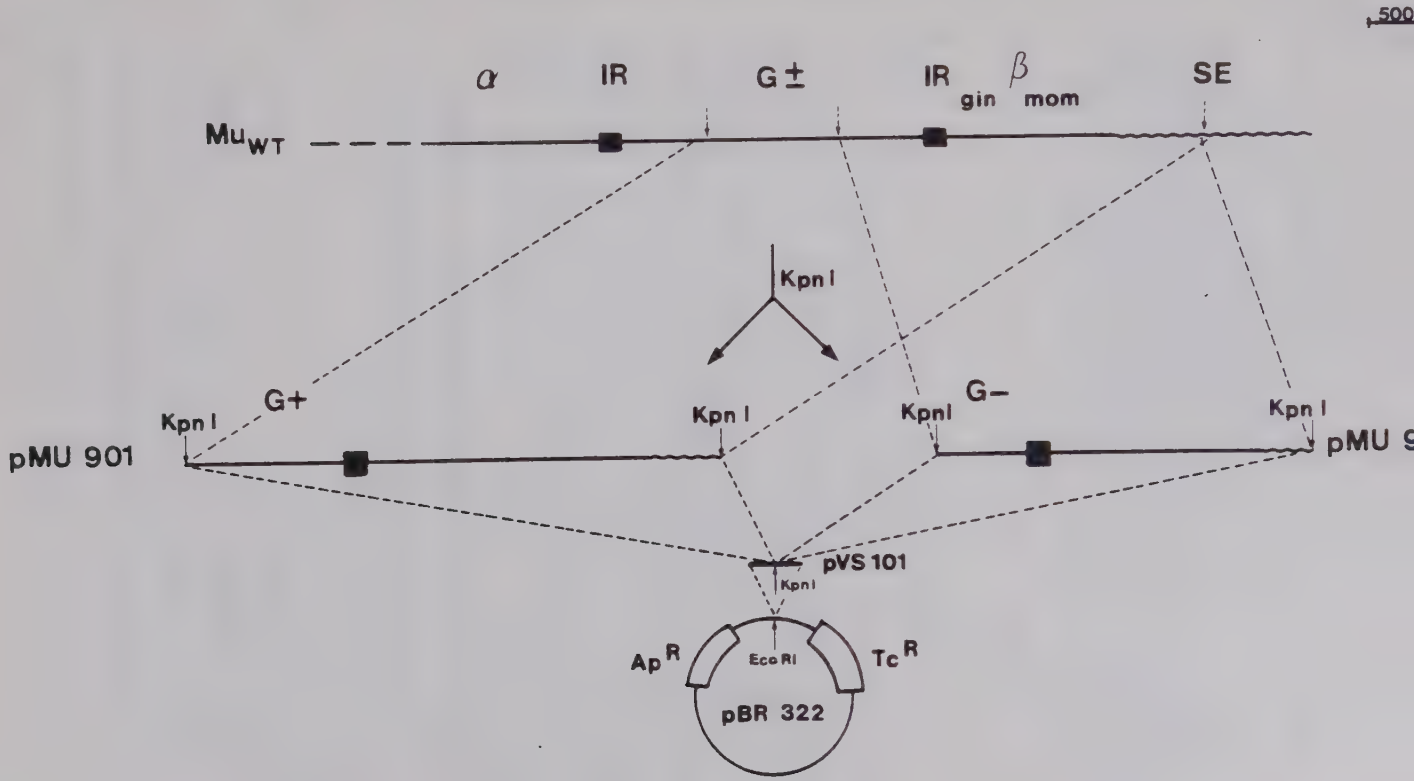
Plasmid	Inversionsenzym	Literatur
pGM1	Gin	Kamp et al., 1979
pGP2	Cin	Ritthaler, 1983
pMS8	Hin	Simon et al., 1980

4.5 Konstruktion von lysogenen Bakterienstämmen

0,2ml des zu lysogenisierenden Bakterienstamms wurden mit 2,5ml NA-Weichagar auf einer YT-Platte verteilt. Auf die Platte wurde ein Tropfen Phagenlysat gegeben und eintrocknen gelassen. Über Nacht entstand bei 32°C ein trüber Plaque. Der darin enthaltene Bakterienrasen wurde auf einer YT-Patte ausgestrichen und bei 32°C über Nacht inkubiert. Die Einzelkolonien wurden auf zwei Platten gepickt, von denen eine bei 32°C und die andere bei 42°C über Nacht inkubiert wurde. Lysogene Stämme waren daran zu erkennen, daß sie bei 32°C runde Einzelkolonien ergaben, während sie bei 42°C lysiert waren.

Bild Nr.7: Struktur der Plasmide pMU901 und pMU902

In pBR322 wurde ein EcoRI Fragment inseriert, das eine KpnI Stelle besaß (pVS101). In diese KpnI Stelle konnten die KpnI Fragmente von Mu inseriert werden, die sich vom G Segment über die β-Region bis ins SE erstreckten. Im Plasmid pMU901 fand sich das KpnI Fragment, das in der G(+) Orientierung des G Segments entstand, im Plasmid pMU902 das Fragment, das in der G(-) Orientierung entstand.


500
α
IR
G±
IR
gin
β
mom
SE
Mu WT
Kpn I
G+
G−
Kpn I
Kpn I
Kpn I
Kpn I
pMU 901
pMU 9
pVS 101
Kpn I
Ap R
Eco RI
Tc R
pBR 322

4.6 Herstellung und Titerbestimmung von Phagenlysaten

Ein lysogener Bakterienstamm wurde in 10ml YT-Medium bei 32°C bis zu einer Trübung von 70 bis 80 O.D. (Klett Summerson Colorimeter, 578nm) wachsen gelassen und dann bei 42°C 20 Minuten hitzeinduziert. Die Bakterien wurden anschließend bei 37°C im Wasserbad 40 Minuten geschüttelt, bis sie lysiert waren, mit 0,2ml Chloroform versetzt und noch weitere 5 Minuten geschüttelt. Danach wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (5°C, 15 Minuten, 4000g). Zur Titerbestimmung des Lysats wurde eine Verdünnungsreihe in TM hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 10µl auf eine vorher mit einer Indikatorkultur präparierten Platte aufgetropft und eintrocknen gelassen. Nach der Inkubation über Nacht bei 42°C konnte die Anzahl der Plaques auf dem Bakterienrasen bestimmt werden. Die Anzahl der Plaques der Verdünnung, bei der die Einzelplaques auszählbar waren, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ergab den Titer der Phagenlösung.

Zur genaueren Bestimmung des Titers wurden die Phagen zusammen mit den Bakterien vorinkubiert. Dazu wurden 0,1ml der Verdünnung mit 0,2ml Bakteriensuspension bei 37°C 10 min inkubiert. Anschließend wurden 3ml NA-Weichagar zugegeben und auf einer YT-Platte verteilt. Die Platten wurden dann bei 42°C über Nacht inkubiert.

4.7 Quantitativer Gin-Test

Der zu testende Stamm wurde mit einem Lysat von DK947 (Mu-gin⁻ G(-)) bei 42°C inkubiert. Durch unspezifische Adsorption gelang es ca. 1% der G(-) Phagen, den G(+) sensitiven Stamm zu infizieren. Konnte der Wirt die Gin-Funktion komplementieren, so fanden sich in der Nachkommenschaft des Phagen Mu G(+)Phagen, die ihrerseits weitere Zellen infizieren und somit sichtbare Plaques bilden konnten. Die Anzahl der Plaques hing somit von der Gin-Aktivität des Teststammms ab. Der Test erfolgte entsprechend der Titerbestimmung von Phagenlysaten. Je 10µl einer Verdünnungsreihe der G(-)Phagen wurden auf die mit dem Teststamm präparierte Platte gegeben und bei 42°C inkubiert. Stämme mit Gin-Aktivität zeigten eine Plattierungseffizienz von 10^5/ml bis 10^6/ml, während auf Teststämmen ohne Gin-Aktivität keine Plaques zu sehen waren (Kamp und Stern, eingereicht).

4.8 Phagen-DNA Präparation

Die Phagen-DNA Präparationen wurden mit geringfügigen Änderungen nach der bei Kahmann et al. (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. 200ml dYT-Medium wurden in einem 1l Nasenkolben mit 5ml einer frischen Bakterienkultur, die den Phagen als Prophagen besaß, angeimpft und bei 32°C bis zu einer Lichtundurchlässigkeit von 90-110 O.D. (Klett) wachsen gelassen. Nach 15 Minuten Hitzeinduktion bei 42°C wurde solange bei 37°C geschüttelt, bis die Lichtundurchlässigkeit ein Minimum erreicht hatte. Nach Zugabe von ca. 0,4ml

Chloroform wurde nochmals 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden $MgSO_4$ (Endkonzentration 1mM), DNase und RNase (Endkonzentration 2µg/ml) hinzugefügt. Nach raschem Abkühlen im Eisbad wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (5^oC, 30 Minuten, 7000g). Die Phagen wurden über Nacht bei 4^oC aus dem Überstand mit 30% PEG-Lösung (w/v; Endkonzentration 10%) und 4M NaCl-Lösung (Endkonzentration 0,4M) ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in möglichst wenig SM-Puffer (5-10ml) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf einen CsCl-Blockgradienten gegeben, bestehend aus CsCl-Lösungen der Dichten 1,4 1,5 und 1,6 (in SM) und 2,5 Stunden bei 5^oC (85000g) zentrifugiert. Die Phagen bildeten eine bläulich-weiße Bande kurz über dem Boden des Zentrifugenröhrchens und wurden durch Austropfen isoliert. Zur weiteren Reinigung der Phagen wurde CsCl-Lösung der Dichte 1,5 bis zu einem Endvolumen von 5-6ml hinzugegeben und 14-18 Stunden bei 5^oC und 120000g abzentrifugiert. Nach Isolierung der Phagenbande wurde zweimal je eine Stunde gegen SM dialysiert . Die Phagenlösung wurde mit dem gleichen Volumen puffergesättigtem Phenol versetzt und mehrere Minuten vorsichtig invertiert. Die Phasen wurden durch kurze Zentrifugation getrennt, und die Phenolphase, die das Phagenprotein enthielt, entfernt. Nach zweimaligem Wiederholen der Extraktion wurde die wäßrige Phase gegen TE-Puffer dialysiert. Konzentration und Reinheit der DNA wurden durch Messung der UV-Absorption bei 260 und 280nm bestimmt. Der Quotient aus $A_{260} : A_{280}$ sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen.

Puffergesättigtes Phenol

460g Phenol wurden mit 250ml 0,5M Tris-HCl-Puffer, pH7,9 (25°C) und 0,8g Hydroxychinolin gemischt. Man trennt die Phenolphase ab und gibt 100ml des obigen Puffers zu.
Die so neutralisierte Lösung kann bei 4°C im Dunkeln längere Zeit stabil aufbewahrt werden.

4.9 Synthese, Reinigung und Klonierung von Oligodeoxynukleotiden

4.9.1 Synthese und Reinigung

Die Oligodeoxynukleotide wurden in einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystems) der Abteilung Oesterhelt synthetisiert. Sie wurden gelöst in 25% Ammoniak zur Verfügung gestellt. Zur Abspaltung der Basenschutzgruppen wurde diese Lösung 5 Stunden bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung an einem Speed Vac Concentrator eingeengt, in 400µl 0,1M Tri-äthyl-ammonium-acetat (TEAA) Puffer resuspendiert und filtriert. Anhand der Di-p-anisylphenyl-methyl- (Di-methoxy-trityl-, DMTR-) Gruppe, die als Schutzgruppe noch am 5'-OH des letzten angebauten Nukleotids verblieben war, wurde das Oligonukleotid mittels HPLC Chromatographie (Säule: Shandon ODS Hypersil 5µm, 5x250mm, Flußrate: 1ml/min, Gradient: 15-30% Acetonitril in 0,1M TEAA-Puffer) aufgetrennt. Die Fraktionen wurden am Speed Vac Concentrator eingeengt, in 80% Essigsäure resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung lyophilisiert, dreimal mit Methanol resuspendiert, eingeengt und in 200µl TE gelöst. Die Ausbeutebestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260nm.

Herstellung von Tri-ethyl-ammonium-acetat (TEAA)-Puffer:

In einem 500ml Dreihalskolben, der mit einem Eis/Wasserbad gekühlt werden konnte, wurden 350ml $Wasser_{bidest}$ vorgelegt. Dazu wurden langsam 70ml Tri-ethyl-amin zugegeben. Über einen Tropftrichter wurden anschließend unter Rühren ca.30ml Essigsäure (99%) zugegeben, bis der PH einen Wert von 7 erreicht hatte. Die Lösung wurde abschließend mit $Wasser_{bidest}$ auf 500ml eingestellt.

4.9.2 Charakterisierung der Oligodeoxynukleotide

Die Charakterisierung der Oligonukleotide erfolgte durch 5'- Endmarkierung mit γ-P^{32}-ATP und Polynukleotidkinase, elektrophoretische Auftrennung auf einem Acrylamidgel und anschließende Autoradiographie. 10pmol Oligodeoxynukleotid wurden mit 5u Polynukleotidkinase und ca. 5µCi γ-P^{32}-ATP (10pmol, 10mCi/ml) in einem Volumen von 25µl bei 37°C und einer Inkubationszeit von 60 Minuten 5'-endmarkiert. 5µl dieser Lösung wurden im Speed Vac Concentrator bis zur Trockene eingeengt und in 5µl Auftragpuffer aufgenommen.

Kinase - Puffer
50mmol/l Tris-HCl, pH7,5 (25°C)
10mmol/l $MgCl_2$
5mmol/l Dithiothreit

Auftragpuffer für Sequenzierungsgel
Zu 100ml Formamid wurden 0,3g Xylencyanol, 0,3g Bromphenolblau und 4ml EDTA (0,25M, pH7,0) zugegeben.

Die Acrylamidlösung wurde filtriert, entgast, mit 0,5ml Ammoniumpersulfat (10%) und 30)l N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylen-diamin (TEMED) versetzt und auf die silikonisierte Platte gegossen, während die Ohrenplatte darüber geschoben wurde. Nach ungefähr 20 Minuten Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die entstandenen Geltaschen sofort mit Laufpuffer (0,1M TBE) gespült, um Nachpolymerisation in den Taschen zu vermeiden.

Die Glasplatten wurden vorbehandelt:

- die Ohrenplatte mit 5% Dimethylchlorosilan in Tetrachlorkohlenstoff, um zu erreichen, daß sie nach Beendigung des Laufs ohne Beschädigung des Gels abgehoben werden konnte;
- die rechteckige Platte mit 15µl Silan in 150µl Essigsäure (10%) und 5ml Äthanol, um dem Acrylamid die Polymerisation an die Glasplatte zu ermöglichen.

Die Lösungen wurden auf den Platten verteilt. Nach dem Trocknen wurde nochmals mit Äthanol nachpoliert.

Acrylamid-Lösung für das 20% Gel:
14,5g Acrylamid
0,5g N,N'-Methylen-bis-acrylamid
31,5g Harnstoff
7,5ml TBE-Puffer (1M)
ad 75ml aqua dest.

TBE - Puffer (1M)
121,1g Trizma Base
51,35g Borsäure
3,72g EDTA
ad 1000ml aqua dest.

1µl der im Auftragpuffer aufgenommenen 5'-endmarkierten Oligodeoxynukleotide wurde auf das 20% Acrylamid-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Oligodeoxynukleotide erfolgte bei 2000V, die Elektrophoresedauer betrug 45min. Danach wurde das Gel in Klarsichtfolie eingewickelt, mit einem Autoradiographie-Film versehen (Kodak XR-5), in eine lichtdichte Kassette verpackt und bei -80°C aufbewahrt. Nach 2-6 Stunden konnten die Autoradiographien entwickelt werden.

4.9.3 Klonierung der Oligodeoxynukleotide

Zur Klonierung der Oligonukleotide mußte die freie 5'-OH Gruppe mit ATP und Polynukleotidkinase phosphoryliert werden. Dies erfolgte analog der oben beschriebenen 5-Endmarkierung mit der Ausnahme, daß 60pmol Oligodeoxynukleotid und 1µl ATP (10mol/l) eingesetzt wurden. Die beiden Einzelstränge wurden im gleichen Verhältnis zusammengegeben, 2

Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur langsam abkühlen gelassen. Zur Ligation wurden gleiche Mengen an Oligodeoxynukleotid und geschnittener Vektor eingesetzt.

4.10 Isolierung von DNA Fragmenten

5-10µg Plasmid DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, je nach dem Volumen des Ansatzes auf 1-5 Geltaschen eines Agarose Gels verteilt und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Anfärbung mit Ethidiumbromid wurde das Agarosestückchen, das das gewünschte DNA Fragment enthielt, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch gegeben. Durch Elektroelution in E-Puffer (45min, 100mA) gelangte das DNA Fragment in die wäßrige Phase des Dialyseschlauchs. Die Lösung wurde über EluTip (Schleicher und Schüll) gereinigt, mit Äthanol gefüllt, mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 50µl TE Puffer resuspendiert.

4.11 Ligierung von DNA-Fragmenten

Nachdem ein kleiner Teil des Restriktionsendonukleaseverdaus des Vektors auf einem Agarose-Gel daraufhin überprüft worden war, daß der Verdau komplett abgelaufen war, wurde der Rest mit 250 µl H_2O verdünnt, phenolisiert, mit Natriumacetat (3M) auf eine Endkonzentration von 300mM eingestellt, mit Äthanol bei -80°C (20min) gefällt und abzentrifugiert (15min, 7000g). Der Niederschlag wurde mit 70%

Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20-30µl TE aufgenommen. Das gereinigte Fragmentgemisch wurde in T4-DNA-Ligase-Inkubationspuffer (20 mM Tris-HCl pH8,0 (25°C), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Dithiotreit) mit 0,6mM ATP und T4-DNA-Ligase inkubiert. Die Menge an Ligase, die Inkubationstemperatur und die Inkubationsdauer wurden entsprechend den Herstellerangaben variiert.

4.12 Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA

Der Transformation mit Plasmid-DNA lagen die von Mandel und Higa (1970) und Cohen et al. (1972) beschriebenen Methoden zugrunde. Zur Präparation kompetenter Zellen wurde dYT-Medium mit 0,5ml einer frischen Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C oder 32°C (lysogene Stämme) bis zu einer Lichtundurchlässigkeit von 100 O.D. (Klett) wachsen gelassen (entspricht $5x10^8$ Zellen/ml). Nach dem Abzentrifugieren in sterilen Schraubröhrchen (0°C, 15 Minuten, 4000g) wurde im halben Volumen TM resuspendiert, abzentrifugiert und im gleichen Volumen 0,05M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 0°C wurden die Zellen abzentrifugiert und erneut in einem $1/_{10}$ Volumen 0,05M $CaCl_2$ aufgenommen. Sollten die kompetenten Zellen zur Lagerung eingefroren werden, wurden sie in 0,05M $CaCl_2$, das 10% Glycerin enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden bei -80°C verwahrt.

0,2ml der kompetenten Zellen und 0,5-1µg DNA wurden zusammen 40 Minuten bei 0°C inkubiert, 3 Minuten auf 42°C bzw. 5 Minuten auf 37°C (lysogene Stämme) erhitzt und 10 Minuten im

Eisbad gekühlt. Nach Zugabe von 1,8ml dYT-Medium wurde die Kultur bei 37 bzw. 32°C eine Stunde anwachsen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit konnten die Transformanten auf geeignete genetische Marker selektioniert werden.

4.13 Schnelle Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly

2ml einer Übernachtkultur wurden in einem großen Eppendorfhütchen abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1ml Tris-Saccharose-EDTA-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 0,2ml 0,2M NaOH/1% SDS-Lösung 5 Minuten bei 4°C stehengelassen. Danach wurden 150µl Natrium'acetat (3M), pH4,8 zugegeben und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge wurde der Überstand in ein kleines Eppendorfhütchen überführt, mit 1ml Äthanol versetzt, 20 Minuten bei 0°C gefällt und abzentrifugiert. Der getrocknete Niederschlag wurde in 0,2ml TE aufgenommen. Zur Identifizierung der Plasmide wurden davon 30µl auf ein 1,2% Agarose-Gel aufgetragen. Sollten die Plasmide geschnitten werden, wurde der noch verbliebene Rest mit RNAse behandelt (3u, 30min, 37°C), phenolisiert, mit Natriumacetat (3M) auf eine Endkonzentration von 0,3M gebracht und mit Äthanol gefällt (-80°C, 20min). Das Sediment wurde mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 50µl TE aufgenommen. Davon wurden 10-15µl für die Verdaus eingesetzt.

Tris/Saccharose/EDTA - Puffer
50 mM Saccharose
25 mM Tris-HCl, pH8,0 (25°C)
10 mM EDTA

4.14 Plasmidpräparation nach Stougaard und Molin

250ml M9CAA - Medium wurden in einem 1l-Nasenkolben mit 2,5ml einer frischen Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C oder 32°C bis zu einer Lichtundurchlässigkeit von 80 O.D. (Klett) wachsen gelassen. Nach Zugabe von Chloramphenicol (Endkonzentration 200µg/ml) wurde weitere 15-20 Stunden bei der entsprechenden Temperatur geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren (0°C, 10 Minuten, 7000g) wurde das Sediment in 1,5ml kaltem Saccharose-Tris-Puffer resuspendiert und mit dem gleichen Puffer auf 2,5ml eingestellt. Die Lysis der Zellen erfolgte dann bei 0°C:

Zunächst wurde die Bakteriensuspension gemischt mit 0,45ml einer frisch hergestellten Lysozym-Lösung (5mg/ml in H_2O), die RNase (Endkonzentration 300µg/ml) enthielt. Nach 5 Minuten wurden 0,9ml Tris-EDTA-Puffer und nach weiteren 5 Minuten 3,6ml Triton-Puffer hinzugefügt. Nach 10 Minuten wurde abzentrifugiert (4°C, 60 Minuten, 21000g) Zum Überstand wurden NaCl (Endkonzentration 0,5 M) und 30%ige PEG-Lösung (Endkonzentration 10%) hinzugefügt. Nach mehrstündigem Stehen bei 4°C erhielt man einen dichten Niederschlag von DNA. Dieser wurde abzentrifugiert (4°C, 5 Minuten, 2500g) und in 1ml TE-Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde in einem Beckman Quick Seal Röhrchen mit 4ml einer CsCl und Ethidiumbromid enthaltenden Stammlösung unterschichtet. Nach mindestens 5 Stunden bei 50000rpm im Vertikalrotor (VTI 65, Beckman; 230000g) konnte die Plasmidbande ausgetropft werden. Das Ethidiumbromid wurde durch

dreimalige Extraktion mit wasser- und CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt. Danach wurde eine Stunde gegen TE-Puffer dialysiert, mit puffergesättigtem Phenol phenolisiert und erneut gegen TE dialysiert. DNA-Konzentration und Reinheit wurden durch Absorptionsmessung bei 260 und 280nm bestimmt.

Puffer für Plasmidpräparationen

Saccharose-Tris - Puffer, pH8,0 (25°C)
25% Saccharose (w/v)
0,05M Tris-HCl, pH8,0 (25°C)

Tris-EDTA - Puffer, pH8,0 (25°C)
0,25M Tris-HCl, pH8,0 (25°C)
0,25M EDTA

Triton - Puffer, pH8,0 (25°C)
0,05M Tris-HCl, pH8,0 (25°C)
0,01M EDTA
2% Triton-X 100 (w/v)

CsCl-Stammlösung
80g CsCl
8ml Ethidiumbromid (Stammlösung 5mg/ml)
52ml TE -Puffer

4.15 Restriktionsenzymanalyse von DNA

4.15.1 Restriktionsendonuklease-Verdau

1µg DNA in TE-Puffer wurde mit 2,5µl 10xVerdaupuffer gemischt, mit H_2O auf ein Endvolumen von 25µl aufgefüllt und mit 1-2u Restiktionsenzym 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert (außer BclI: 50°C und TaqI: 65°C). Anschließend wurde die Probe mit Saccharose (Endkonzentration 10%) und Bromphenolblau (Endkonzentration 0,025%) gemischt und auf das Agarose-Gel aufgetragen.

Puffer für die Verdaus mit Restriktionsendonukleasen

LS-Puffer : HpaII, XhoII, HinPI
10mM Tris-HCl, pH7,4 (25°C)
6mM $MgCl_2$
1mM Dithiothreit

LS-Puffer (6mmol NaCl) : AccI, KpnI
10 mM Tris-HCl, pH7,4 (25°C)
6 mM NaCl
6 mM $MgCl_2$
1 mM Dithiothreit

MS-Puffer : HindII, HindIII, HaeIII, Sau96, Sau3AI, SspI
10 mM Tris-HCl, pH7,4 (25°C)
50 mM NaCl
10 mM $MgSO_4$
1 mM Dithiotreit

HS-Puffer : EcoRV, SalI, PstI, AhaIII, BclI, TaqI
50 mM Tris-HCl, pH7,4 (25°C)
100 mM NaCl
10 mM $MgSO_4$
1 mM Dithiotreit

Für die Restriktionsenzyme BamHI, BglII und EcoRI wurden die von den Herstellern angegebenen Puffer eingesetzt.

4.15.2 Agarose Plattengel-Elektrophorese

Für die Elektrophorese (Sugden et al., 1975; Kamp et al., 1977) wurden Agarose-Gele der Konzentrationen 1,2%, 1,4% und 2,0% verwendet. Die Agarose wurde in 1xE-Puffer durch Erhitzen im siedenden Wasserbad gelöst. Sobald die Lösung auf ungefähr 60°C abgekühlt war, wurde das Gel zwischen die Glasplatten gegossen und erkalten gelassen. Die Konzentration der Gele, die Stromstärke und die Elektrophoresedauer variierten mit der Größe der zu untersuchenden Fragmente und wurden bei den einzelnen Experimenten im Detail aufgeführt.

10 x E (Elektrophorese) - Puffer
48,46g Trizma Base
50ml NaOH (1M)
3,73g EDTA
22ml Eisessig
ad 1000ml aqua dest.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5µg/ml) angefärbt. Die DNA-Fragmente wurden durch Anregung des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids mit kurzwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und dann durch einen Orangefilter (Kodak Nr.2, 306nm) mit Polaroidfilm 55P/N oder 57P/N photographiert.

4.15.3 Größenberechnung der Restriktionsfragmente

Zwischen dem Logarithmus der Anzahl der Basenpaare der Fragmente und ihrer relativen Beweglichkeit konnte näherungsweise eine lineare Beziehung angenommen werden, aus der die Größe unbekannter DNA-Fragmente berechnet werden konnte. Als Größenmarker dienten die aufgrund der Sequenz bekannten HindIII Fragmente von Lambda (Sanger et al., 1982) oder die HaeIII- bzw. AluI-Fragmente von pBR322 (Sutcliffe, 1978).

4.16 Konstruktion von Plasmiden

4.16.1 Konstruktion der pIR Plasmide

Die isolierten DNA Fragmente wurden in die BamHI- bzw. EcoRV Stelle des Plasmids pMU901 inseriert. Da die Schnittstellen innerhalb der Tetracyclin Resistenz lagen, konnte nach Tetracyclin sensitiven Klonen selektioniert werden.

pIR200

0,3pmol der beiden Einzelstränge wurden mit der gleichen Menge des mit BamHI linearisierten Vektors ligiert. Der Nachweis der Insertion des Oligodeoxynukleotids erfolgte durch Verdau mit Sau96I. Im Sau96I Verdau vergrößerte sich das 352bp große pMU901 Fragment durch die Insertion des Oligodeoxynukleotids auf 370bp (siehe Bild Nr.15).

pIR300

Das 320bp große AhaIII/EcoRV Fragment wurde aus dem Plasmid pMU804 isoliert und in die EcoRV Stelle von pMU901 inseriert (siehe Bild Nr.12).

pIR700

Das HpaII Fragment wurde aus pMU804 isoliert und in die AccI Stelle von pUC7 inseriert (pIR601). In JM83 konnten die Klone als lac$^-$ Transformanten selektioniert werden. Aus pIR601 wurde das HpaII Fragment mit BamHI ausgeschnitten und in die BamHI Stelle von pMU901 inseriert (siehe Bild Nr.12).

pIR800

3,6pmol der beiden Einzelstränge wurden mit 0,3pmol des mit BamHI linearisierten Vektors ligiert (siehe Bild Nr.12).

pIR500

Aus Adenovirus DNA wurde das 275bp große BglII Fragment isoliert und in die BamHI Stelle von pMU901 inseriert. Die Orientierung des Fragments konnte an Hand eines in dem Frag-

ment vorhandenen HpaII Schnitts festgestellt werden. Aus dem 217bp großen HpaII Fragment entstand je nach Orientierung des BglII Fragments ein 265bp und ein 227bp Fragment, oder ein 478bp und ein 14bp Fragment. Der Test auf Inversion erfolgte durch Verdau mit PstI und EcoRV (siehe Bild Nr.15).

4.16.2 Konstruktion der pGS Plasmide

Als Vektor wurde das Plasmid pGS2 benutzt (erhalten von Wolfgang Schulz), das sich vom Plasmid pGK1800 (McKennedy et al., 1981) durch den Austausch der SmaI Stelle durch eine BamHI Stelle unterschied.

pGS3100

10µg Adenovirus DNA wurden mit BglII geschnitten und auf einem 2% Agarose Gel aufgetrennt. Das 275bp Fragment wurde isoliert und in das Plasmid pGS2 eingesetzt, das zuvor mit BamHI linearisiert und mit Phosphatase behandelt worden war. Klone, die das Adenovirus Fragment enthielten, waren im HaeIII Verdau an der Vergrößerung des 910bp Fragments auf 1160bp zu erkennen. In dieses Plasmid wurde das die Mu Sequenzen tragende EcoRI Fragment aus pMU901 HinPI(2247)::Kan 65 inseriert. Durch Verdau mit PstI wurden die Plasmide pGS3101 und pGS3102 identifiziert, in denen das EcoRI Fragment in den verschiedenen Orientierungen vorlag (siehe Bild Nr.16).

pGS3200, pGS5200

5µg der Plasmide pMU901 HinPI(1646)::Kan 101 und pMU901 AhaIII(1641)::Kan 8 wurden in getrennten Ansätzen zu-

sammen mit der gleichen Menge des Plasmids pGS2 mit EcoRI verdaut, ligiert und damit CSH50 transformiert. In schnellen Plasmidpräparationen wurde die Orientierung der EcoRI Fragmente bestimmt. Die resultierenden Plasmide pGS3001 und pGS5001 wurden mit BamHI linearisiert, mit Phosphatase behandelt und mit der gleichen Menge an Oligodeoxynukleotid ligiert. Klone, die die IR Sequenz enthielten, waren im HaeIII Verdau an der Vergrößerung des 910bp Fragments auf 940bp zu erkennen. Im HaeIII/ BamHI Verdau konnte die Orientierung der IR Sequenz festgestellt werden.

4.16.3 Konstruktion der pBS Plasmide

Um pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10 als Vektor benutzen zu können, mußte zunächst die im Ampicillin Resistenzgen des Vektors sitzende PstI Stelle entfernt werden. Dazu wurde CSH50 mit pBR322 transformiert, das zuvor mit PstI linearisiert worden war. Eine schnelle Plasmidpräparation eines Ap^S Stammes lieferte ein Plasmid, dessen PstI Stelle deletiert war (pBR322ΔPstI). In die EcoRI Stelle dieses Plasmids, oder des Plasmids pUC7, wurde das EcoRI Fragment aus pMU901 Sau 3AI(1432-1629)::Kan 10 inseriert, das die Mu Sequenzen trug (pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10ΔPstI, bzw. pUC7-EcoRI MupMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10). Diese Vektoren wurden mit PstI geschnitten, mit Phosphatase behandelt und zusammen mit den Fragmenten ligiert. Nach der Transformation in CSH50 wurde nach Kn^S Stämmen selektioniert. Die darin enthaltenen Plasmide wurden in schnellen Plasmidpräparationen charakterisiert und anschließend in Mu gekreuzt (siehe Bild Nr.22).

pBS1200

Als Vektor diente pUC7, in den das die Mu Sequenzen tragende EcoRI Fragment aus pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10 inseriert worden war (pUC7-EcoRI MupMU901 Sau3AI(1432-1629) ::Kan 10). 0,2pmol der beiden Oligodeoxynukleotide wurden mit der gleichen Menge des mit PstI linearisierten Vektors ligiert.

pBS503

Das AhaIII Fragment wurde aus pMU901 ausgeschnitten, isoliert, mit PstI Linkern versehen, mit PstI nachgeschnitten und in die PstI Stelle von pBR322 inseriert. Nach der Transformation in CSH50 konnten die Klone als Ap^S Stämme selektioniert werden. Die Charakterisierung des resultierenden Plasmids pBS503 erfolgte mit HaeIII. Darüberhinaus wurden die in dem AhaIII-Fragment vorhandenen HinPI und Sau3AI Stellen nachgewiesen (siehe Bild Nr.9). Aus dem Plasmid pBS503 wurde das AhaIII Fragment mit PstI ausgeschnitten, isoliert und in pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10 Δ PstI inseriert (pBS1300).

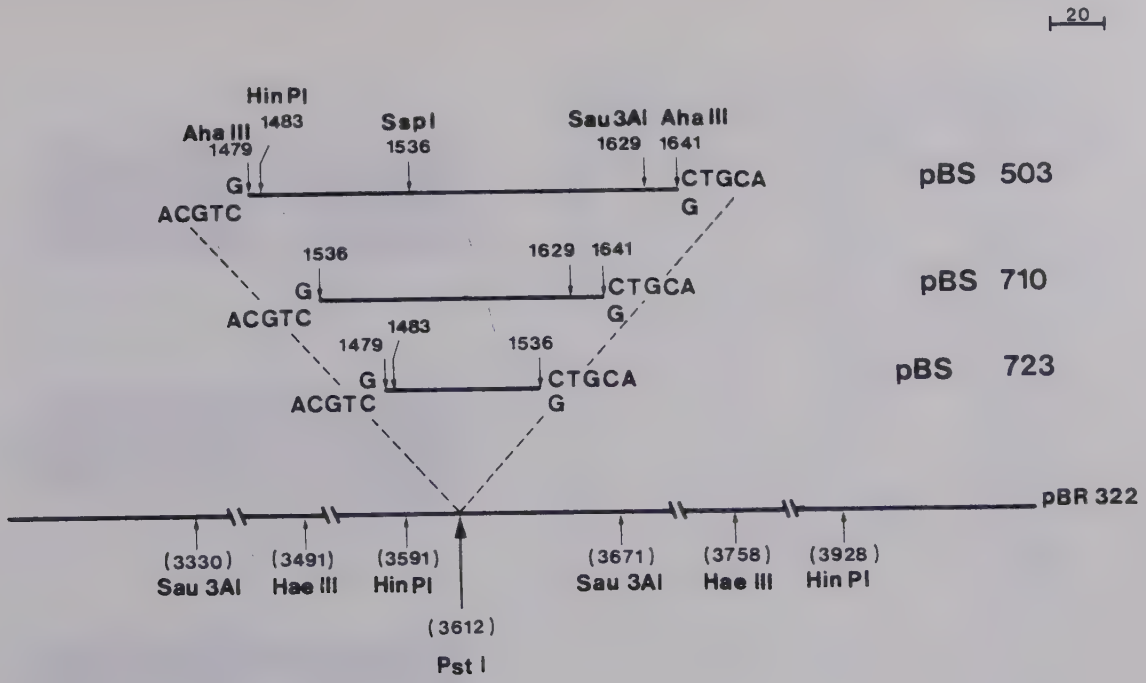
pBS710 und pBS723

Das AhaIII Fragment wurde aus pBS503 mit PstI ausgeschnitten, isoliert, mit SspI nachgeschnitten, mit PstI Linkern versehen, mit PstI nachgeschnitten und in die PstI Stelle von pBR322 inseriert. Die Selektion und die Charakterisierung der entstandenen Plasmide erfolgte analog

pBS503, wobei pBS710 das 105bp lange AhaIII-SspI Fragment enthielt und in pBS723 das 57bp lange SspI-AhaIII Fragment gefunden wurde (siehe Bild Nr.8). Zur weiteren Charakterisierung wurde der in pBS710 vorhandene Sau3AI Schnitt sowie der in pBS723 vorhandene HinPI Schnitt nachgewiesen (siehe Bild Nr.9). Aus diesen Plasmiden wurden die Subfragmente mit PstI ausgeschnitten und in pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10 ΔPstI inseriert (pBS1400 und pBS1500).

Bild Nr.8: Konstruktion der Plasmide pBS503, 710, 723

Die Positionsangaben der Restriktionsschnittstellen in den Mu Fragmenten beziehen sich auf die rechte Anheftungsstelle des Phagen Mu, die Null gesetzt wurde; die in runde Klammern gesetzten Positionsangaben beziehen sich auf Positionen in pBR322.


20
Hin PI
Aha III
1479
1483
Sspl
1536
Sau3AI
1629
Aha III
1641
G
CTGCA
ACGTC
G
pBS 503
1536
1629
1641
G
CTGCA
ACGTC
G
pBS 710
1479
1483
1536
G
CTGCA
ACGTC
G
pBS 723
pBR 322
(3330)
Sau 3AI
(3491)
Hae III
(3591)
Hin PI
(3612)
Pst I
(3671)
Sau 3AI
(3758)
Hae III
(3928)
Hin PI

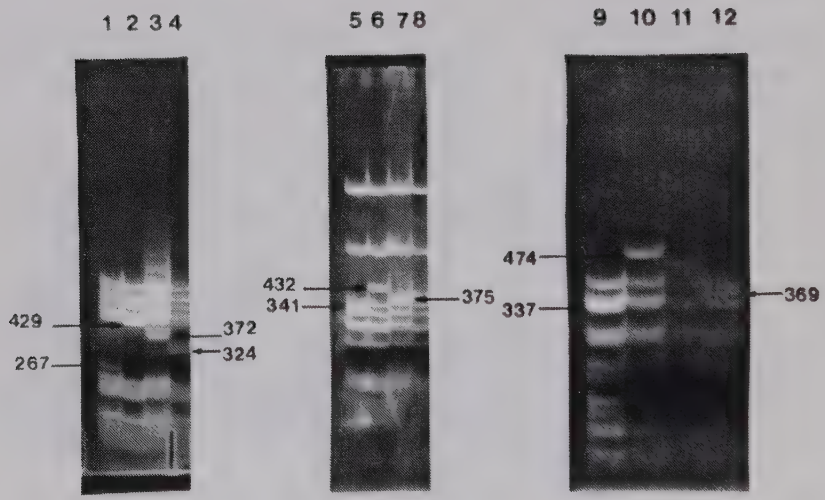


Bild Nr.9: pBS503, 710, 723/ HaeIII, Sau3AI, HinPI
1-4: pBR322, pBS503, 710 und 723/ HaeIII (2% Agarose, 75mA, 2h)
Das 267bp große pBR322 Fragment (Spur 1) vergrößerte sich durch die Insertion des 162bp großen AhaIII Fragments auf 429bp (Spur 2), durch Insertion des 105bp großen AhaIII-SspI Fragments auf 372bp (Spur 3) und durch Insertion des 57bp großen SspI-AhaIII Fragments auf 324bp (Spur 4);
5-8: pBR322, pBS503, 710 und 723/ Sau3AI (2% Agarose, 75mA, 2h)
Das 341bp große pBR322 Fragment (Spur 5) wurde aufgrund des im AhaIII Fragment vorhandenen Sau3AI Schnitts in ein 432bp Fragment (Spur 6) und ein 71bp Fragment (nicht sichtbar) und aufgrund des im AhaIII-SspI Fragment vorhandenen Sau3AI Schnitts in ein 375bp (Spur 7) und ein 71bp Fragment (nicht sichtbar) zerlegt;
9-12: pBR322, pBS503, 710 und 723/ HinPI (2% Agarose, 75mA, 3h)
Das 337bp große pBR322 Fragment (Spur 9) wurde aufgrund des im AhaIII Fragment vorhandenen HinPI Schnitts in ein 474bp Fragment (Spur 10) und ein 25bp Fragment (nicht sichtbar) und aufgrund des im SspI-AhaIII Fragment vorhandenen HinPI Schnitts in ein 369bp (Spur 12) und ein 25bp Fragment (nicht sichtbar) zerlegt;

4.17 Sequenzspezifische Mutagenese

4.17.1 Partielle Verdaus

Von den Restriktionsenzymen wurden Verdünnungsreihen angefertigt, die mit jeweils 3µg der Plasmide pMU901 bzw. pMU902 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Ein Aliquot, das einem µg des Ansatzes entsprach, wurde auf einem 1,2% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, während der Rest der partiellen Verdaus 3 mal phenolisiert, mit Äthanol gefällt, mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20µl TE resuspendiert wurde. Die Auswertung des Agarose-Gels lieferte den partiellen Verdau mit der Enzym-Verdünnung, die den größten Anteil an linearisierter DNA geliefert hatte.

4.17.2 Ligation, Transformation und Selektion

1 µg des partiell verdauten Plasmids wurde ligiert mit dem aus dem Plasmid pUC-4K isolierten Kanamycin Resistenz Fragment.

Tabelle mit den verwendeten Restriktionsenzymen:

für den Partial	für pUC-4K
AhaIII	HindII
SspI	"
TaqI	AccI
HinPI	"
Sau3AI	BamHI
BclI	"

Nach der Transformation in CSH50 wurden die Insertionsmutanten als Ampicillin-, Tetracyclin- und Kanamycinresistente Transformanten selektioniert.

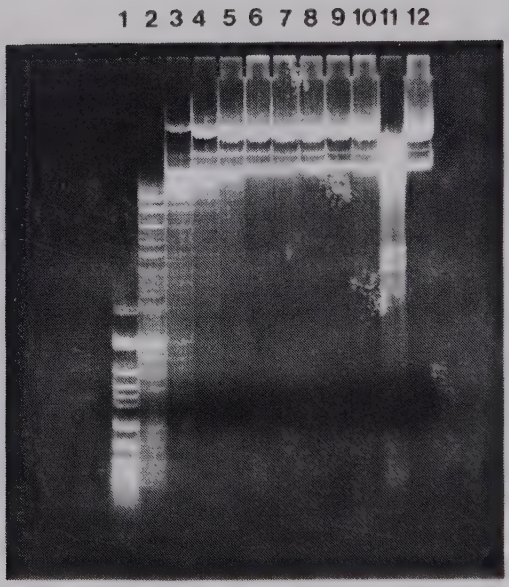


Bild Nr.10: HpaII Partials des Plasmids pMU901 (1,2% Agarose, 75mA, 3h)
1-10: Partials mit fallender Konzentration an HpaII
11: λ - HindIII
12: pMU901, ungeschnitten

4.17.3 Nomenklatur

In der Bezeichnung der Mutante war das Ausgangsplasmid (pMU901 oder pMU902), das zum Partial verwendete Restriktionsenzym (z.B. HinPI), die Position der Insertion des Kanamycinresistenzfragments (bei Deletionen wurden beide Positionen angegeben) und die Isolatnummer enthalten. Die Insertion des Kanamycinresistenzfragments wurde durch ::Kan verdeutlicht, während der Linker, der bei dessen nachträglichen Entfernung zurückblieb (siehe Bild Nr.22), mit ::MCS ('multiple cloning site') dargestellt wurde.

4.17.4 Charakterisierung der Mutanten

Von den Mutanten wurden schnelle Plasmidpräparationen gemacht, die mit HindII verdaut wurden. Bei den Mutagenesen, bei denen die flankierenden HindII Schnitte von pUC-4K nicht restauriert wurden (HinPI, AhaIII, SspI), konnten die Insertionen durch Vergrößerung des getroffenen HindII Fragments, ebenso wie Deletionen, die ein entsprechendes kleineres HindII Fragment lieferten, identifiziert werden. Da das Kan-Fragment von PstI Schnittstellen flankiert wurde, zerlegte ein HindII/PstI Verdau das vergrößerte HindII Fragment in das Kan-Fragment und zwei Fragmente, deren Größen die Lokalisation der Insertion bzw. Deletion erlaubte. In den meisten Mutanten war das 1450bp Fragment betroffen, das den G(R)-β Bereich von den Positionen 1107 bis 2557 umfaßte. Bei den Mutagenesen, bei denen die flankierenden HindII Schnitte von pUC-4K restauriert wurden (TaqI, Sau3AI, BclI) genügte ein HindII Verdau, um die zur Lokalisation der Insertion

oder Deletion notwendigen Fragmente zu erhalten.

HinPI Mutagenese

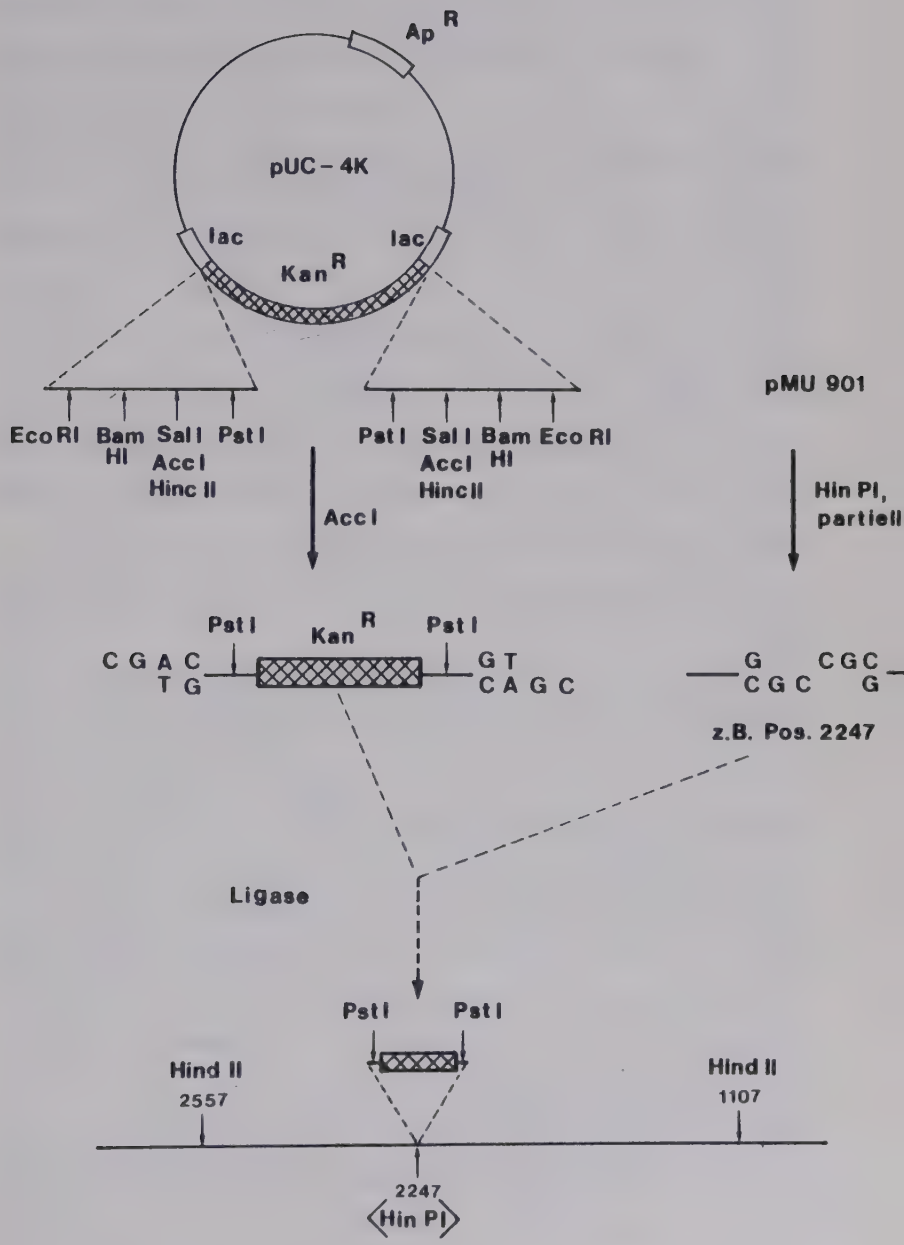
Die Mutanten pMU901 HinPI(1473)::Kan 79 und pMU901 HinPI (1483)::Kan 98 wurden von Beate Stern erhalten. Ausgehend von Transformanten, die Beate Stern isoliert hatte, erfolgte die Isolierung von weiteren HinPI Mutanten.

Größe der HindII/PstI Fragmentpaare bei Insertion des Kan-Fragments im HindII Fragment (Pos. 1107-2557) in Position:

Position	Fragmentgrößen (bp)
2348	213/1249
2247	314/1148
2013	548/914
1809	752/710
1800	761/701
1749	812/650
1725	836/626
1646	915/547
1483	1078/384
1473	1088/374

Zwischen den Positionen 1800 und 1809 konnte aufgrund des geringen Unterschieds der Fragmentgrößen nicht unterschieden werden.

Bild Nr.:11 Sequenzspezifische Mutagenese am Beispiel von HinPI


Ap R
pUC – 4K
lac
lac
Kan R
EcoRI Bam HI Sal I Pst I
Acc I
Hinc II
Pst I Sal I Bam Eco RI
Acc I
Hinc II
pMU 901
Hin PI, partiell
Acc I
Pst I
Kan R
Pst I
C G A C
T G
G T
C A G C
G
C G C
C G C
G
z.B. Pos. 2247
Ligase
Pst I
Pst I
Hind II
2557
Hind II
1107
2247
Hin PI

pMU901 HinPI(2013)::Kan 2, pMU901 HinPI(2013)::Kan 71, pMU901 HinPI(1646)::Kan 101: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 910 und 560bp, was einer Insertion in Position 2013 oder in 1646 entsprach. Die weitere Charakterisierung dieser Mutanten erfolgte mit HpaII und HpaII/PstI. Die Größe der HpaII/PstI Fragmentpaare bei Insertion des Kan-Fragments in eine der beiden möglichen Positionen betrug:

Position	Fragmentgrößen (bp)
2013	501/517
1646	868/150

Aufgrund der HpaII/PstI Fragmente konnte die Insertion des Kan-Fragments in den Mutanten pMU901 HinPI(2013)::Kan 2 und pMU901 HinPI(2013)::Kan 71 in Position 2013, und in der Mutante pMU901 HinPI(1646)::Kan 101 in der Position 1646 lokalisiert werden.

pMU901 HinPI(1809/1800-1646)::Kan 11, pMU901 HinPI(1809/1800-1646)::Kan 69: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 760 und 540bp, was einer Deletion von 150bp zwischen den Positionen 1809/1800 und 1646 entsprach.

pMU901 HinPI(1809/1800-1749)::Kan 12: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 750 und 650bp, was einer Deletion von 50bp entsprach. Die weitere Kartierung erfolgte mit Sau96I, wobei im Sau96I/PstI Verdau zwei Fragmente der Größen 710 und 640 auftauchten, was einer Deletion zwischen den Positionen 1809/1800 und 1749 entsprach.

pMU901 HinPI(1809/1800-2870)::Kan 32: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 1650 und 700bp. Da zusätzlich zum 1450bp Fragment das 1900bp Fragment verschwunden

war, mußte es sich um eine Deletion von 1000bp handeln, wobei der HindII Schnitt in Position 2557 deletiert worden sein mußte. Die Deletion lag folglich zwischen den Positionen 1809/1800 und 2870.

pMU901 HinPI(2247-2013)::Kan 49: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 910 und 310bp, was einer Deletion von 240bp zwischen den Positionen 2247 und 2013 entsprach.

pMU901 HinPI(2247)::Kan 65: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 1180 und 315bp, was einer Insertion in Position 2247 entsprach.

AhaIII Mutagenese

Die Mutanten pMU901 AhaIII(1479-1641)::Kan 109 und pMU901 AhaIII(1479(::Kan 116 wurden von Beate Stern erhalten.

pMU901 AhaIII(1641)::Kan 8: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 920 und 530bp, was einer Insertion in Position 1641 entsprach.

pMU901 AhaIII(1479)::Kan 18: Der HindII/PstI Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 1080 und 370bp, was einer Insertion in Position 1479 entsprach. Diese Mutante war identisch mit pMU901 AhaIII(1479)::Kan 116.

Sau3AI Mutagenese

Die Mutanten pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10 und pMU901 Sau3AI(1432-888)::Kan 21 wurden von Beate Stern erhalten.

pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10: Der HindII Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 920 und 330bp, was einer Deletion zwischen den Positionen 1629 und 1432 entsprach.
pMU901 Sau3AI(1432-888)::Kan 21: Der HindII Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 1120 und 2300bp. Da zusätzlich zum 1450bp Fragment auch das 2500bp Fragment verschwunden war, mußte es sich um eine Deletion von 530bp handeln. Die weitere Kartierung erfolgte in pMU901 Sau3AI(1432-888)::MCS 21 (Beate Stern), in dem das Kan-Fragment mit PstI deletiert worden war. Der HpaII Verdau zeigte, daß der HpaII Schnitt in Position 1171 deletiert war, da das 325bp und das 642bp Fragment fehlten. Das zusätzlich aufgetretene 440bp Fragment wurde im HpaII/PstI Verdau in ein 380bp Fragment (Pos. 464-888) und ein nicht identifizierbares 60bp Fragment (Pos. 1496-1432) zerlegt. Dies entsprach einer Deletion zwischen den Positionen 1432 und 888.

SspI Mutagenese

Die Partials wurden im Plasmid pMU902 gemacht, da der in diesem Plasmid enthaltene G(L) Bereich weniger SspI Stellen aufwies als der G(R) Bereich in pMU901. Nach der Selektion auf die Antibiotikamarker wurde auf gin$^-$ Transformanten selektioniert. Das HindII Fragment in pMU902, das den G(L)-ß Bereich enthielt, hatte eine Länge von 990bp. Daher lieferte der HindII/PstI Verdau von pMU902 SspI(1536)::Kan 31 zwei Fragmente der Größe 530 und 430bp, was einer Insertion in Position 1536 entsprach.

TaqI Mutagenese

Nach der Selektion auf gin⁻ Transformanten wurde nach der Mutante gesucht, die den β-Bereich ausgehend von der TaqI Stelle in Position 1673 deletiert hatte.
pMU901 TaqI(1264-1673)::Kan 132: Der HindII Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 880 und 160bp, was einer Deletion von 400bp zwischen den Positionen 1673 und 1264 entsprach. Der HpaII Verdau zeigte, daß der HpaII Schnitt in Position 1496 deletiert war, da die 1018 und 325bp großen Fragmente fehlten und da statt dessen ein 940bp großes Fragment aufgetreten war.

BclI Mutagenese

Die E.coli dam Methylase methyliert Adenin in der Sequenz GATC, die Bestandteil der Erkennungssequenz von BclI ist. Da die methylierte Sequenz von BclI nicht geschnitten werden konnte, mußte das Plasmid pMU901 AhaIII(1479)::MCS 116, aus dem das Kanamycinresitenzfragment zuvor mit PstI entfernt worden war (Beate Stern), vor dem partiellen Verdau in dem dam⁻ Stamm GM33 vermehrt werden. Die Insertion erfolgte im 2500bp HindII Fragment, das im Anschluß an das 1450bp große HindII Fragment in β lag.
pMU901 BclI(888)::Kan 18: Der HindII Verdau lieferte zwei Fragmente der Größe 2300 und 200bp, was einer Insertion in Position 888 entsprach.

4.18 Kreuzung der Mutanten in Mu

4.18.1 Kreuzung von Mutanten mit Antibiotikamarker

Die Stämme, die im Plasmid das Kanamycinresistenzfragment inseriert hatten, wurden mit Mu cIts62 lysogenisiert. Mit dem aus diesen Lysogenen erhaltenen Lysaten wurde CSH50 lysogenisiert, der Kn^s war. Durch Ausstreichen auf Kan-Platten wurden die CSH50-lysogenen selektioniert, die einen Kn^r Phagen enthielten. Das Lysat eines solchen Lysogenen wurde auf CSH50 titriert, die Einzelplaques auf einen CSH50 Rasen gepickt und bei 32°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques die nun Lysogene enthielten, auf Kan-Platten gepickt. Von einer Kn^r Einzelkolonie wurde ein Lysat gemacht, mit dem C600, CSH50/pGM1, CSH50/pGP2 und CSH50/pMS8 lysogenisiert wurden.
Die aus diesen Kreuzungen erhaltenen Phagen wurden durch eine dreistellige Zahl charakterisiert (z.B. Mu-108). Sie setzte sich zusammen aus der ersten Stelle, die das Restriktionsenzym anzeigte, das zur Mutagenese verwendet worden war: AhaIII-1, HinPI-2, Sau3AI-3, BclI-5, TaqI-6, SspI-8, und der Isolatnummer.
Ausnahmen: pMU901 AhaIII(1479-1641)::Kan 109: Mu-109
pMU901 AhaIII(1479)::Kan 116: Mu-116
pMU901 TaqI(1673-1264)::Kan 132: Mu-632

4.18.2 Kreuzung von Mutanten ohne Antibiotikamarker

RR1(Mu-518) wurde mit dem Plasmid, das die zu kreuzende Mutation trug, transformiert. Mit dem aus diesem Lysogenen erhaltenen Lysat wurde RR1 lysogenisiert. Das aus diesen RR1

Lysogenen erhaltene Lysat wurde auf CSH50(P7) titriert. Die Einzelplaques wurden auf CSH50 gepickt und bei 32°C über Nacht inkubiert, um lysogene Stämme zu erhalten. Diese wurden auf Kan-Platten gepickt. Von den Kn^s Einzelkolonien wurden Lysate gemacht und auf CSH50 Einzelplaques isoliert, um eventuell noch vorhandene P7 Phagen auszuschließen. Lysate aus diesen Einzelplaques wurden auf E.cloacae titriert, um sicherzustellen, daß sie gin$^-$ waren.

4.19 Inversionstest

4.19.1 Inversion in den pMU901-Derivaten (pIR-Plasmide)

1 µg DNA wurde mit 1-2u EcoRV und BamHI in BamHI-Puffer 2 Stunden bei 37°C inkubiert, auf ein Agarose Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Inversion wurde durch das Auftreten von Inversionsbanden nachgewiesen.

4.19.2 Inversion in den galK-Plasmiden

N100 wurde mit den Plasmiden der Serien pGS3100, pGS3200 und pGS5200 transformiert und auf McConkey Gal Ap Platten ausplattiert. Von der Übernachtkultur einer Einzelkolonie wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Es wurde die Verdünnung gewählt, die ausplattiert auf einer McConkey Gal Ap Platte ca. 200-500 Einzelkolonien ergab. Nach der Inkubation bei 37°C konnten entstandene rote und weiße Einzelkolonien ausgezählt werden.

4.19.3 Inversion in Phagenmutanten der β-Region

Die C600- bzw. CSH50/pGM1 Lysogenen wurden auf Kan-Platten ausgestrichen und bei 32°C 24 Stunden inkubiert. Mit einer auf der Platte hochgewachsenen Einzelkolonie wurde eine 10ml dYT Kultur angeimpft und durch Induktion des Prophagen ein Lysat gemacht. Das Lysat wurde auf CSH50, dem Indikatorstamm für G(+) Phagen und auf Enterobacter cloacae, dem Indikatorstamm für G(-) Phagen titriert. Der Quotient aus der Anzahl der Plaques auf E.cloacae zu der Anzahl der Plaques auf CSH50 wurde als Inversionsrate definiert. Um sicherzustellen, daß während der Wachstumsphase im Lysat keine Phagenmutanten zu Mu cIts62 revertiert waren, wurden die Einzelplaques auf Kanamycinresistenz überprüft.
Zur Abschätzung des Fehlers wurde die Inversionsrate mehrerer Lysate des gleichen Stamms bestimmt. Die Werte differierten um Faktor 5-10.
Für die Mutante Mu-108 wurden die Inversionsraten für beide Orientierungen des Kan-Fragments bestimmt. Sie unterschieden sich nicht.

4.19.4 Inversion in Phagenmutanten des G-Segments

Aus den C600 Lysogenen wurde die Phagen-DNA isoliert, mit den Restriktionsenzymen EcoRV und KpnI geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Inversion wurde durch das Auftreten von Inversionsbanden nachgewiesen.

5. Resultate

5.1 Eingrenzung der Inversions-Stelle

Sowohl die Anheftungsstelle des Phagen Lambda (attP) als auch die 'res-site' in den Transposons der Tn3 Familie weisen mehrere DNA Segmente auf, die Bindungsstellen für Enzyme darstellen, die am Rekombinationsvorgang teilnehmen. Diese können sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch um die Stelle gruppiert sein, in der das Crossing over bei der Rekombination passiert. Auch für das sequenzspezifische Rekombinationssystem des Phagen Mu wurde angenommen, daß solche DNA Segmente existieren. In Analogie zur Anheftungsstelle des Bakteriophagen Lambda wurden die Stellen, die bei der Gin-abhängigen sequenzspezifischen Rekombination erkannt wurden, als Inversionsstelle bezeichnet. Mutanten, die die Inversionsstelle in irgend einer Form beeinträchtigten und dadurch erkannt wurden, daß in ihnen in Gegenwart von Gin keine oder nur wenig Inversion beobachtet werden konnte, wurden als inv^- Mutanten bezeichnet. Zu einer ersten Charakterisierung der Inversions-Stelle sollte die Frage geklärt werden, ob und in welchem Bereich des G-Segments und den angrenzenden α - und β -Regionen solche Sequenzen zu finden sind. Der Bereich des G-Segments, der sich bei der G(+) Orientierung des G-Segments, an die α -Region anschließend links befand, wurde G(L) und der Bereich, der sich rechts befand, wurde G(R) genannt.

5.1.1 Subklonierung von α-IR-G(L) Fragmenten

Aus einem Plasmid wurden DNA Fragmente isoliert, die den IR und einen unterschiedlich großen Anteil an flankierenden Sequenzen der α-Region und der G(L)-Region enthielten. Diese wurden in das Plasmid pMU901 inseriert, das den G(R)-Bereich einschließlich des IRs und die komplette β-Region einschließlich des gin Gens besaß. Rekombination zwischen den IRs sollte zur Inversion des von den IRs eingeschlossenen DNA Segments führen, was durch Restriktionsenzymanalyse nachgewiesen werden könnte. Diese würde neben den zu erwartenden Fragmenten zusätzliche, sogenannte Inversionsfragmente liefern, die dadurch entstanden, daß sich die Lage einer Restriktionsschnittstelle bei der Inversion des betreffenden DNA Segments ändert. Durch Überprüfung der Rekombinationsfähigkeit eines IRs, der von einem immer kleiner werdenden Anteil von α- und G(L) Sequenzen flankiert wurde, sollte in α und in G(L) eine Lokalisation von DNA Segmenten möglich sein, die am Rekombinationsvorgang teilnehmen.
Zunächst wurde das AhaIII-EcoRV Fragment, das neben dem IR 115bp des G-Segments und 172bp der α-Region enthielt, in pMU901 inseriert. Die Orientierung ergab sich aus der Restaurierung des EcoRV Schnitts links oder rechts vom inserierten AhaIII-EcoRV Fragment (siehe Bild Nr.12). Zwei Inversionsbanden, die neben den erwarteten Banden bei der Restriktionsenzymanalyse des Plasmids pIR321 entstanden, dokumentierten die Inversion (siehe Bild Nr.13).
Eine weitere Verkürzung der den IR flankierenden Sequenzen war möglich durch Klonierung des HpaII-Fragments, das nur

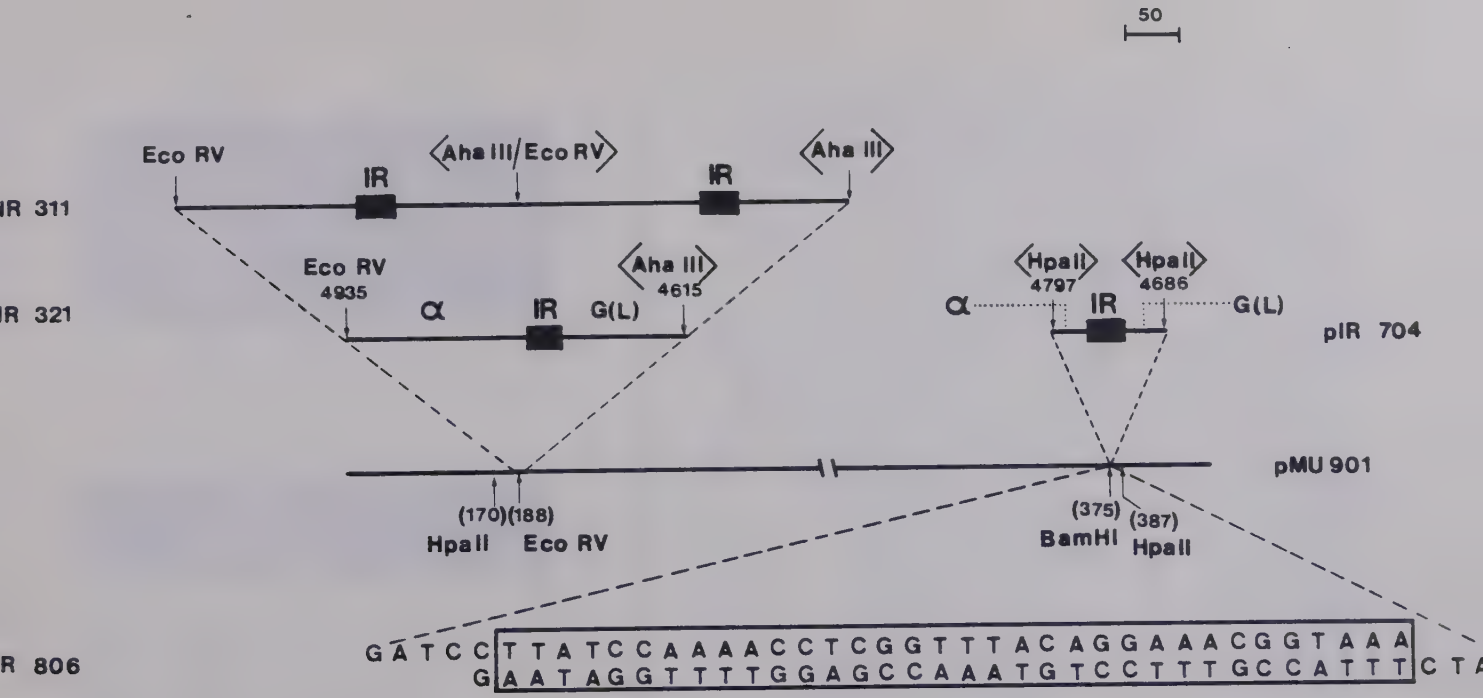
noch 44bp der α-Region und 34bp des G-Segments besaß. Das HpaII Fragment wurde zunächst in pUC7 subkloniert. Aus diesem Plasmid konnte es mit BamHI ausgeschnitten und in die BamHI Stelle von pMU901 inseriert werden (siehe Bild Nr.12). Da innerhalb des Fragments keine Restriktionsschnittstellen vorhanden waren, anhand derer die Orientierung des Fragments hätte bestimmt werden können, wurde eine Reihe von Plasmiden auf Inversion getestet. Die Restriktionsenzymanalyse des Plasmids pIR704 lieferte zusätzliche Fragmente, die die Inversion in dem Plasmid belegten (siehe Bild Nr.13).

Da eine weitere Verkürzung der flankierenden Sequenzen durch Klonierung von DNA Fragmenten nicht mehr möglich war, wurde die Sequenz des IR an einem DNA-Synthesizer synthetisiert. Die so erhaltenen Einzelstränge bildeten nach der Hybridisierung einen Doppelstrang, der zusätzlich zur IR Sequenz 5' Überhänge besaß, aufgrund derer er in die BamHI Stelle von pMU901 inseriert werden konnte (siehe Bild Nr.12). Die Überhänge hatten allerdings ein unterschiedliches Aussehen, so daß bei der Klonierung nur eine der beiden BamHI Stellen restauriert wurde. Durch Regenerierung dieser Schnittstelle links oder rechts vom IR konnte die Orientierung des IRs durch Restriktionsenzymanalyse festgelegt werden. Beim Verdau mit EcoRV und SalI traten Inversionsbanden auf, die den Beweis erbrachten, daß auch in diesem Plasmid Inversion erfolgt war (siehe Bild Nr.13).

In den Plasmiden der Serien pIR300, 700 und 800 wurden der IR mit und ohne flankierenden Sequenzen auf seine Fähigkeit hin überprüft, mit einem zweiten IR zu rekombinieren. In allen Plasmiden konnte Inversion beobachtet werden. Da die Inversionsbanden die gleiche Intensität aufwiesen wie die erwarteten Banden, konnte geschlossen werden, daß die Wachstumsdauer einer Übernachtkultur ausgereicht hatte, Gleichgewicht zwischen den beiden Orientierungen herzustellen. Das bedeutete, daß am Übergang α-IR-G(L) außer dem IR keine zusätzlichen Sequenzen zu einer effizienten Rekombination mit dem IR in der G(R)- β Region notwendig waren.

Bild Nr.12: Konstruktion der Plasmide pIR300, 700, 800

Die Positionsangaben der Mu Fragmente beziehen sich auf die rechte Anheftungsstelle von Mu, die Null gesetzt wurde; die in runde Klammern gesetzten Positionsangaben beziehen sich auf Positionen in pBR322. Die in eckige Klammern gesetzten Restriktionsschnittstellen wurden bei der Ligation nicht restauriert.


50
Eco RV
IR
Aha III/Eco RV
IR
Aha III
IR 311
Eco RV
4935
α
IR
G(L)
Aha III
4615
IR 321
HpaII
4797
HpaII
4686
α
IR
G(L)
pIR 704
pMU 901
(170)(188)
HpaII
Eco RV
(375)
BamHI
(387)
HpaII
R 806
G A T C C T T A T C C A A A A C C T C G G T T T A C A G G A A A C G G T A A A
G A A T A G G T T T T G G A G C C A A A T G T C C T T T G C C A T T T C T A

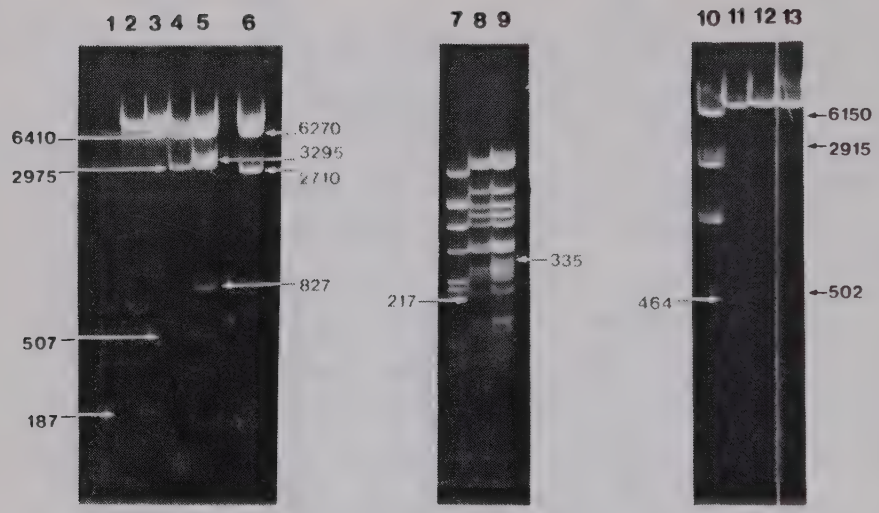


Bild Nr.13: Restriktionsenzymanalyse pIR300, pIR700, pIR800

1-6: pIR300, 700/ BamHI, EcoRV (1,4% Agarose, 75mA, 2h)
1: Größenmarker (6630bp, 2530bp, 1200bp)
2: pMU901/ BamHI, EcoRV;
3: pIR304/ -"- ; das inserierte 320bp Fragment liegt innerhalb des 8910bp großen Fragments aus pMU901, das sich dadurch auf 9230bp vergrößerte.
4: pIR 320/ -"- ; das 187bp große pMU901 Fragment (Spur 2) vergrößerte sich durch die Insertion des 320bp großen Fragments auf 507bp. Durch die Inversion entstanden die Inversionsbanden der Größen 6410bp und 2975bp.
5: pIR311/ -"- ; ausgehend vom 827bp großen BamHI-EcoRV Fragment zeigten die Fragmente der Größen 3295bp, 2975bp und 507bp die Anwesenheit der rekombinierten Plasmide an (siehe auch Bild Nr.14).
6: pIR 704/ -"- ; durch Inversion entstanden die Inversionsbanden der Größen 6270bp und 2710bp.
7-9: pIR 704/ HpaII (2% Agarose, 75mA, 2h)
7: Größenmarker pBR322/ AluI;
8: pMU901/ HpaII;
9: pIR704/ HpaII; das 217bp große pMU901 Fragment (Spur 8) vergrößerte sich auf 335bp.
10-13: pIR800/ EcoRV, SalI (1,2% Agarose, 75mA, 2h)
10: Größenmarker (6630bp, 2530bp, 1200bp);
11: pMU901/ EcoRV, SalI;
12: pIR 809/ -"- ; durch Insertion des 40bp großen Oligodeoxynukleotids vergrößerte sich das 464bp große pMU901 Fragment (Spur 11) auf 502bp (Spur 12 und 13).
13: pIR 813/ -"- ; durch Inversion entstanden die Inversionsbanden bei 6150bp und 2915bp.

Präferenz bei Multimeren

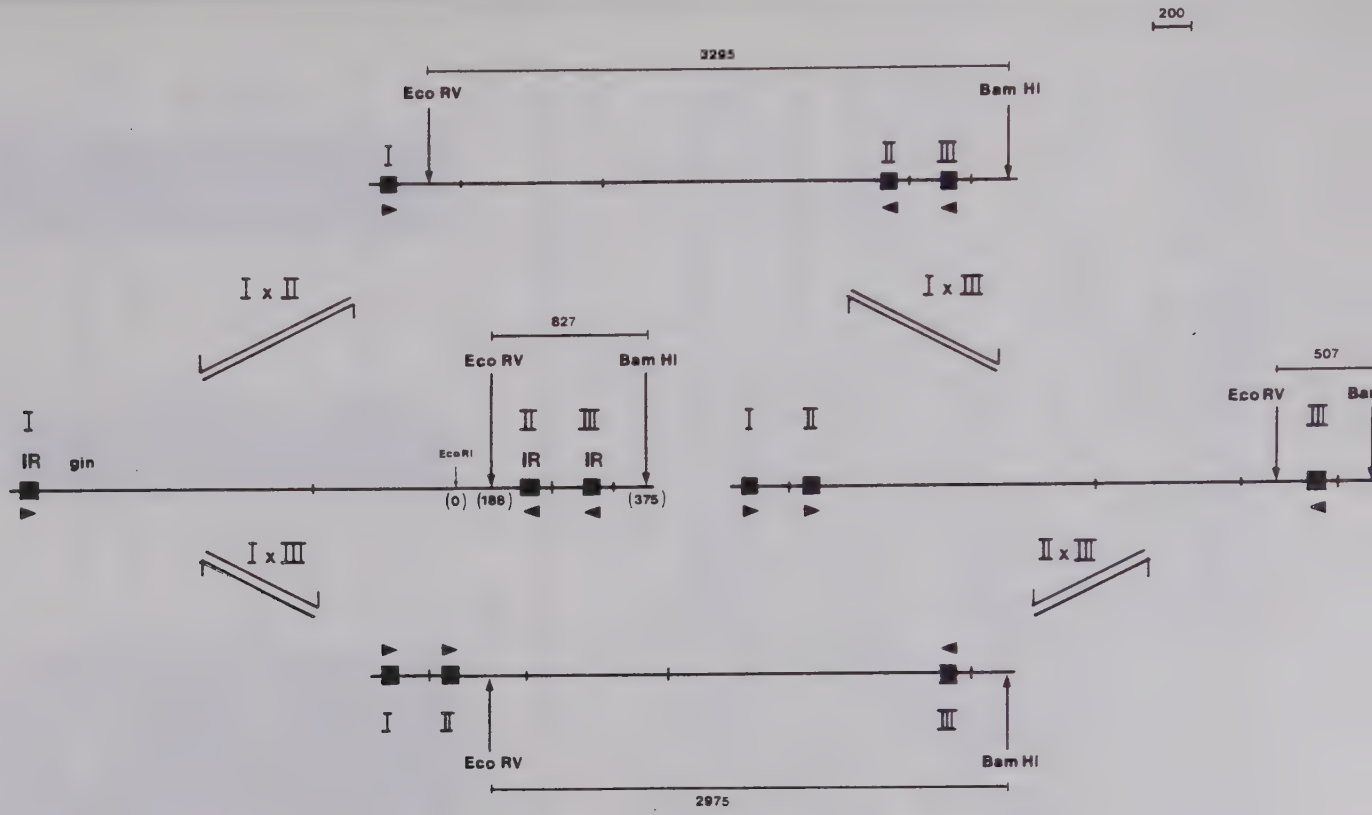
Bei der Charakterisierung der pMU901 Derivate, die das AhaIII-EcoRV Fragment inseriert hatten, wurde das Plasmid pIR311 gefunden, das das Fragment in Tandem-Orientierung enthielt (siehe Bild Nr.12). Dadurch war ein Plasmid mit 3 IRs entstanden. Die Restriktionsenzymanalyse dieses Plasmids zeigte drei Paare von Inversionsfragmenten (siehe Bild Nr.13), die aus der Rekombination des IRs aus pMU901 mit den beiden IRs in den AhaIII-EcoRV Fragmenten resultierten (siehe Bild Nr.13 und Nr.14). Da die Inversionsbanden nach Berücksichtigung ihrer Länge gleiche Intensität aufwiesen, mußte die Rekombination zwischen den verschiedenen IRs mit gleicher Effizienz erfolgt sein.

5.1.2 Rekombination eines verkürzten IRs

Nachdem feststand, daß ein IR ausreichte, um mit dem IR am Übergang von G(R)-β effizient zu rekombinieren, wurde der Frage nachgegangen, ob auch ein verkürzter IR rekombinieren kann. Ein Sequenzvergleich der IRs von Salmonella typhimurium, Mu und Pl hatte gezeigt, daß die Sequenz der äußeren 14bp, die gleichzeitig den kompletten IR des Hin Systems darstellte, bis auf wenige Basenaustausche in allen IRs konserviert war. Daher sollten verkürzte IR Sequenzen getestet werden, die die äußeren konservierten Sequenzen enthielten.

Bild Nr.14: Rekombination im Plasmid pIR311

Die in runde Klammern gesetzten Positionsangaben beziehen sich auf Positionen in pBR322. Die Dreiecke unter den IRs zeigen die Orientierung der IRs an.


200
3295
Eco RV
Bam HI
I
II
III
I x II
827
Eco RV
Bam HI
I
IR
gin
II
III
Eco RI
IR
IR
(0)
(188)
(375)
I x III
507
Eco RV
I
II
III
I x III
II x III
I
II
III
Eco RV
Bam HI
2975

Insertion des Oligodeoxynukleotids

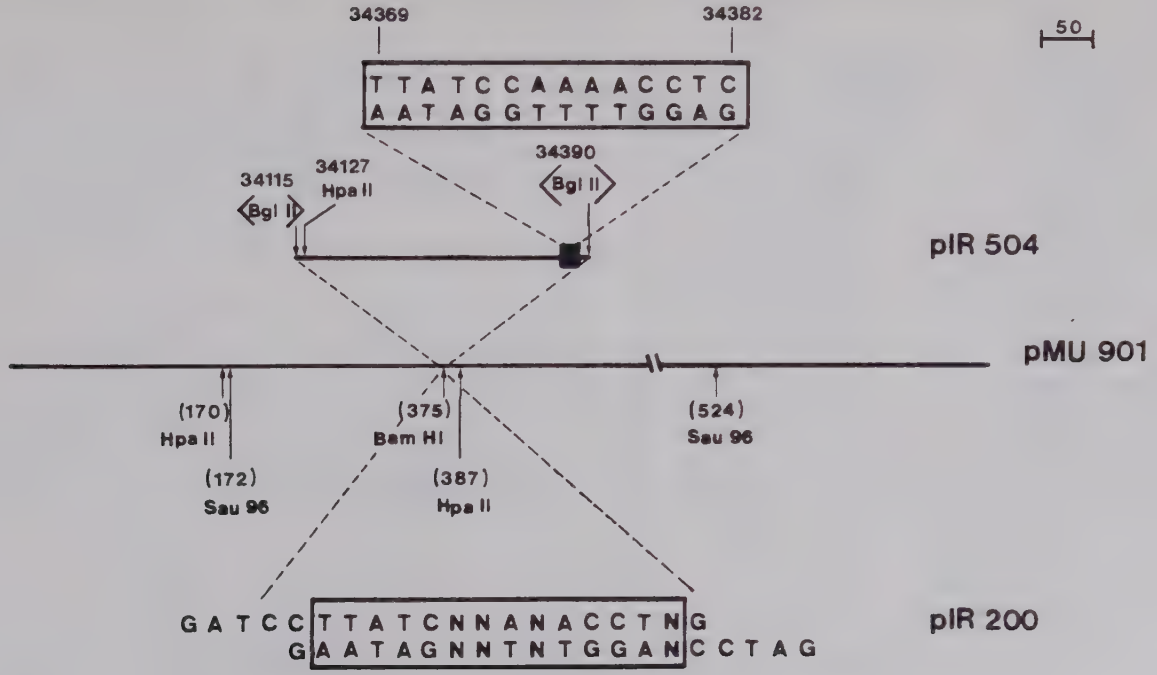
Zunächst wurde ein Oligodeoxynukleotid synthetisiert, das dem äußeren Teil des IRs entsprach. Da die Sequenz der 14bp des Mu IRs anderweitig verfügbar war, wurde die IR Sequenz bei der Synthese mutagenisiert. Dies erfolgte in der Weise, daß in jeder Position im IR, in der die Sequenz nicht konserviert war, zufallsbedingt eines der vier verschiedenen Nukleotide eingebaut wurde. Für den Einzelstrang ergaben sich daraus 256 mögliche Sequenzkombinationen. Nach der Hybridisierung wies das Oligodeoxynukleotid 5'-Überhänge auf, aufgrund derer es unter Restauration der Schnittstellen in die BamHI Stelle von pMU901 inseriert werden konnte (siehe Bild Nr.15). Die Plasmide aus 100 Klonen wurden durch Restriktionsenzymanalyse auf Inversion getestet. Es konnte kein Plasmid gefunden werden, das Inversionsbanden zeigte.

Insertion eines Fragments mit dem halben IR

Mittels Computeranalyse wurde in den Genbanken nach Teilen der IR Sequenz gesucht. Aufgrund der Homologie zu den IRs der anderen Inversionssysteme lag bei der Suche der Schwerpunkt auf Sequenzen, die den äußeren Teil des IRs enthielten.

Bild Nr.15: Konstruktion der Plasmide pIR200, 500

Die in runde Klammern gesetzten Positionsangaben beziehen sich auf Positionen in pBR322. Die in eckige Klammern gesetzten Restriktionsschnittstellen wurden bei der Ligation nicht restauriert.


34369
34382
50
T T A T C C A A A A C C T C
A A T A G G T T T T G G A G
34390
Bgl II
34115
Bgl II
34127
Hpa II
pIR 504
pMU 901
(170)
Hpa II
(172)
Sau 96
(375)
Bam HI
(387)
Hpa II
(524)
Sau 96
G A T C C T T A T C N N A N A C C T N G
G A A T A G N N T N T G G A N C C T A G
pIR 200

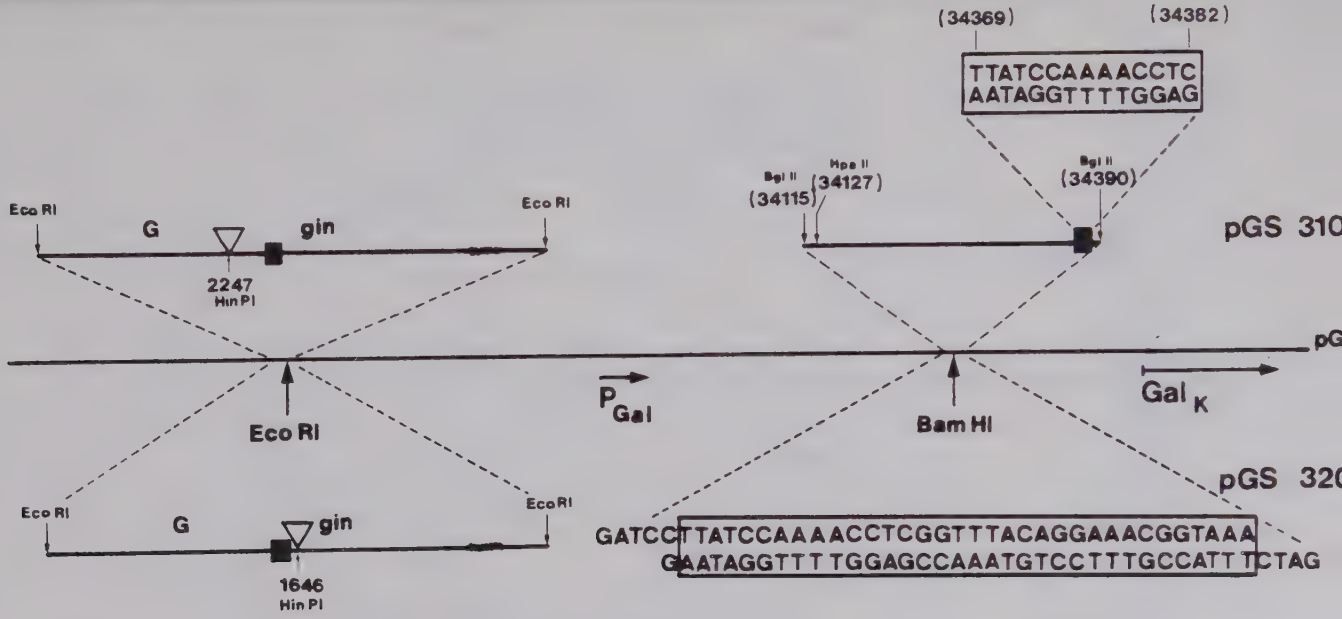
In Adenovirus wurde die Sequenz 5' TTATCCAAAACCTC 3' gefunden, die den äußeren 14bp des IRs von Mu entsprach. Sie lag innerhalb eines BglII-Fragments, das isoliert und in die BamHI-Stelle von pMU901 inseriert wurde (siehe Bild Nr.15). Die Restriktionsenzymanalyse des resultierenden Plasmids zeigte keine Inversionsbanden. Auch nach einer verlängerten Inkubationszeit von 10 Übernachtkulturen konnten keine Inversionsbanden nachgewiesen werden.
Es zeigte sich, daß der Inversionstest durch Restriktionsenzymanalyse nicht sensitiv genug war, um die Rekombination von verkürzten IR Sequenzen im Plasmid pMU901 untersuchen zu können. Daher wurde ein sensitiverer, biologischer Test angewendet.

Inversion in den galK-Plasmiden

Das Plasmid pGS2 besaß das Gen für die Galaktokinase (galK) und den dazugehörigen Promotor. Links und rechts vom Promotor befanden sich Schnittstellen für EcoRI und BamHI, in die Fragmente inseriert wurden, die IR Sequenzen trugen. Bei einer Gin-abhängigen Rekombination zwischen den IRs sollte der Promotor invertiert werden. Da das galK Gen dann nicht mehr transcribiert werden könnte, wären die betreffenden Plasmide $galK^-$.

Bild Nr.16: Konstruktion der Plasmide pGS3100 und pGS3200

Die Positionsangaben der Mu Fragmente beziehen sich auf die rechte Anheftungsstelle von Mu, die Null gesetzt wurde; die in runde Klammern gesetzten Positionsangaben beziehen sich auf Positionen in der Adenovirus Sequenz (Herisse et al., 1981).


(34369)
(34382)
TTATCCAAAACCTC
AATAGGTTTTGGAG
Bgl II
(34115)
Hpa II
(34127)
Bgl II
(34390)
pGS 310
Eco RI
G
gin
Eco RI
2247
Hin PI
pG
Eco RI
P Gal
Bam HI
Gal K
pGS 320
Eco RI
G
gin
Eco RI
1646
Hin PI
GATCCTTATCCAAAACCTCGGTTTACAGGAAACGGTAAA
GAATAGGTTTTGGAGCCAAATGTCCTTTGCCATTTCTAG

Führte man die Untersuchungen in N100 durch, der ebenfalls galK$^-$ war, und plattierte man die transformierten N100 auf McConkey Gal Ap Platten aus, konnte man galK$^+$ Plasmide an den entstehenden roten Einzelkolonien erkennen, während Stämme mit galK$^-$ Plasmiden weiße Einzelkolonien ergaben (McKennedy et al., 1981).

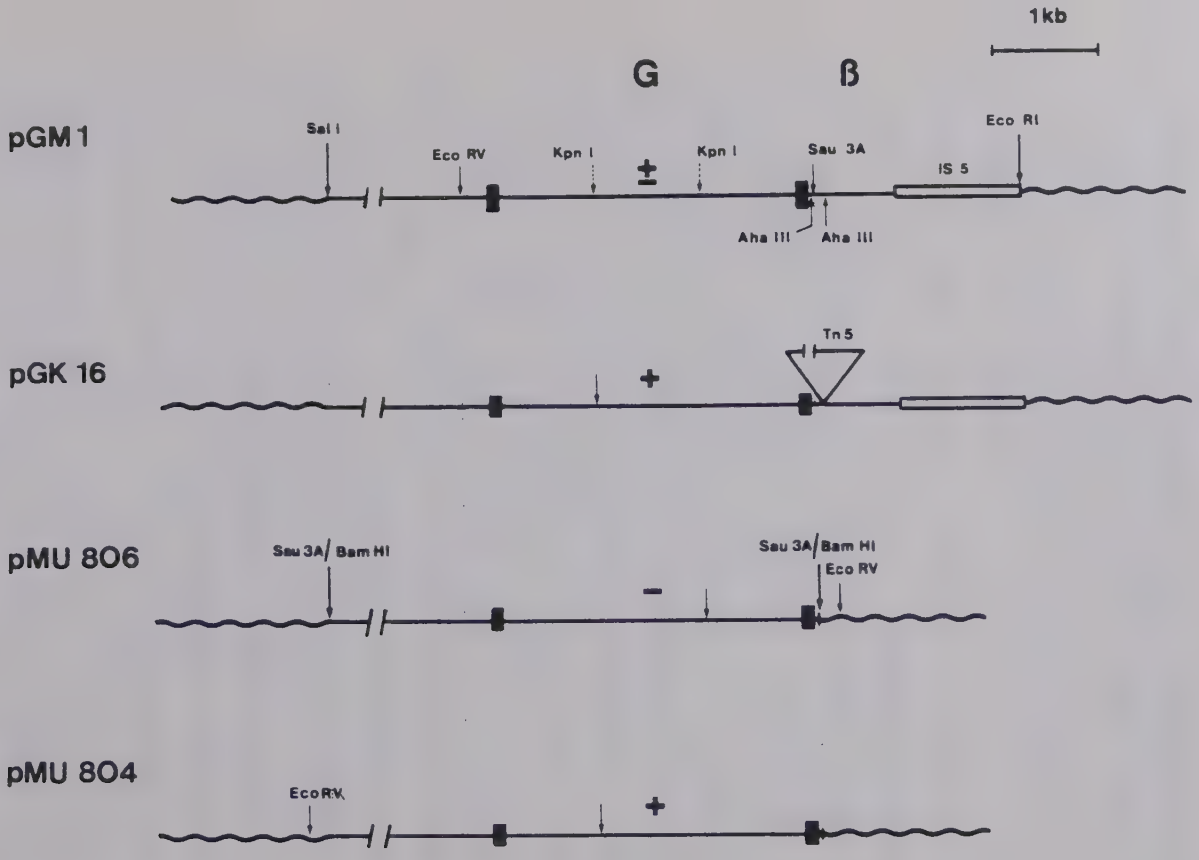
Zunächst wurden Plasmide konstruiert, die das bereits beschriebene Oligodeoxynukleotid auf der einen Seite des galK Promotors besaßen und auf der anderen Seite das EcoRI Fragment aus einem pMU901 Derivat, das das Kanamycinresistenzgen trug. Da das Plasmid gin$^+$ war, zeigte sich, wie schon in pIR800, daß die IR Sequenz ausreichte, um mit dem im EcoRI Fragment vorhandenen IR effizient zu rekombinieren. In pGS3201, in dem die IRs in antiparalleler Orientierung vorlagen, konnten nämlich Inversionsbanden nachgewiesen werden. In N100 wurden allerdings nur rote Einzelkolonien gefunden, da durch die unbehinderte Rekombination in der Einzelkolonie eine Mischung aus galK$^+$ und galK$^-$ Plasmiden vorlag. Dagegen produzierte das Plasmid pGS3202, in dem die IRs in paralleler Orientierung vorlagen, ca. 25% weiße Einzelkolonien, die irreversibel galK$^-$ blieben. Die Charakterisierung dieser Plasmide ergab, daß in ihnen der Bereich zwischen den IRs deletiert worden war. Da damit auch der Promotor verloren ging, wurden diese Plasmide irreversibel galK$^-$. Wurde das die IR Sequenz tragende Oligodeoxynukleotid ersetzt durch das Adenovirus Fragment, das die äußere Hälfte der IR Sequenz enthielt, konnten weder in paralleler noch in antiparalleler Orientierung der IR Sequenzen weiße Einzel-

kolonien gefunden werden. Selbst nach einer verlängerten Wachstumsphase von 5 Übernachtkulturen konnten unter ca. 4000 roten Einzelkolonien keine weißen entdeckt werden. Daraus wurde geschlossen, daß die äußere Hälfte des IRs nicht ausreicht, um eine sequenzspezifische Rekombination nachweisen zu können.

5.1.3 Inversion in subklonierten G-Segmenten

Es wurde bereits früher gezeigt, daß das klonierte G-Segment im Plasmid pGM1 invertieren kann (Kamp et al., 1979). Dieses Plasmid besitzt neben einem größeren Teil der α-Region und dem G-Segment 850bp der β -Region. Durch Klonierung des Sau3AI Fragments, das neben einem Teil der α-Region und dem kompletten G-Segment nur noch 50bp der β-Region besaß, entstanden die Plasmide pMU804 und pMU806, wobei das G-Segment in pMU804 in der G(+) und in pMU806 in der G(-) Orientierung vorlag. Da die Plasmide durch die Verkürzung der β-Region $\underline{gin}^-$ geworden waren, mußten sie mit einem $\underline{gin}^+$ Prophagen komplementiert werden. Durch Restriktionsenzymanalyse mit KpnI und EcoRV konnte weder in pMU804 noch in pMU806 Inversion des G-Segments nachgewiesen werden. Dies lieferte einen ersten Hinweis darauf, daß in der β -Region ein DNA Segment liegen mußte, das die Inversion beeinflußte.

Bild Nr.17: Karte von pGM1, pMU804, 806 und pGK16


1kb
G
ß
pGM1
Sal I
Eco RV
Kpn I
±
Kpn I
Sau 3A
IS 5
Eco RI
Aha III
Aha III
pGK 16
Tn5
+
pMU 806
Sau 3A/ Bam HI
−
Sau 3A/ Bam HI
Eco RV
pMU 804
Eco RV
+

Ein weiteres Indiz dafür lieferte das Plasmid pGK16. Es war ein Derivat von pGM1, das eine Tn5 Insertion in der Mitte des gin Gens besaß (Chow und Kamp, nicht publiziert). Die genauere Kartierung ergab, daß die Tn5 Insertion zwischen der Sau3AI Stelle in Position 1629 und der SspI Stelle in Position 1536 liegen mußte. Auch in diesem Plasmid konnte nach der Komplementation mit Mu keine Inversion nachgewiesen werden. Selbst nach einer verlängerten Wachstumsphase von 30 Übernachtkulturen konnte weder in den Plasmiden pMU804 und 806 noch im Plasmid pGK16 Inversion durch Restriktionsenzymanalyse nachgewiesen werden. Da die SspI Stelle zum IR einen Abstand von ca. 140bp hatte, war offensichtlich ein größerer Bereich der β-Region, der zwischen dem IR und der SspI Stelle liegen mußte, zur Inversion notwendig.

Die bisherigen Experimente hatten gezeigt, daß die Inversionsstelle ein asymmetrisches Aussehen haben muß. Während auf Sequenzen der α-Region und des linken Teils des G-Segments verzichtet werden konnte, ohne daß die Rekombination beeinträchtigt worden wäre, verursachten die Veränderungen des β-Bereichs den Verlust der Fähigkeit zur Inversion. Um diese Beeinträchtigung der Inversion quantifizieren zu können, wurde ein Testsystem gewählt, in dem die Mutanten im Phagen in einem wesentlich sensitiveren Inversionstest untersucht werden konnten.

Die Tn5 Mutagenese, die bereits zu dem Plasmid pGK16 geführt hatte, konnte für dieses Testsystem nicht benutzt werden, da der DNA Zuwachs durch die Tn5 Insertion ~5400bp betrug. Mu verfügt aber nur über eine zusätzliche Verpackungskapazität

von ca. 1500bp. Die Phagen-DNA, die durch homologe Rekombination mit dem Plasmid pGK16 entstanden wäre, hätte daher nicht verpackt werden können. Statt dessen erfolgte die Mutagenese nach einer von Vieira und Messing (1982) beschriebenen Methode.

Aus der bekannten Sequenz des zu mutierenden DNA Segments wurden Restriktionsschnittstellen identifiziert, die an interessanten Stellen lagen. Nach dem partiellen Verdau des Plasmids, das das zu mutierende DNA Segment trug, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen erfolgte Ligation mit dem Kanamycinresistenzgen aus Tn903.

Diese Methode hatte den Vorteil, daß auf die Insertion des Fragments direkt selektioniert und daß die Lage der Insertion an Hand der PstI Stellen, die das Fragment flankierten, kartiert werden konnte. Da das Kanamycin Fragment nur eine Größe von 1200bp hatte, konnten die auf dem Plasmid konstruierten und charakterisierten Mutanten in den Phagen gekreuzt und verpackt werden. Es entstandenen Insertionsmutanten, in denen das Kan-Fragment in eine Schnittstelle des benutzten Restriktionsenzyms inseriert worden war, und Substitutionsmutanten, in denen ein Fragment gegen das Kan-Fragment ausgetauscht worden war.

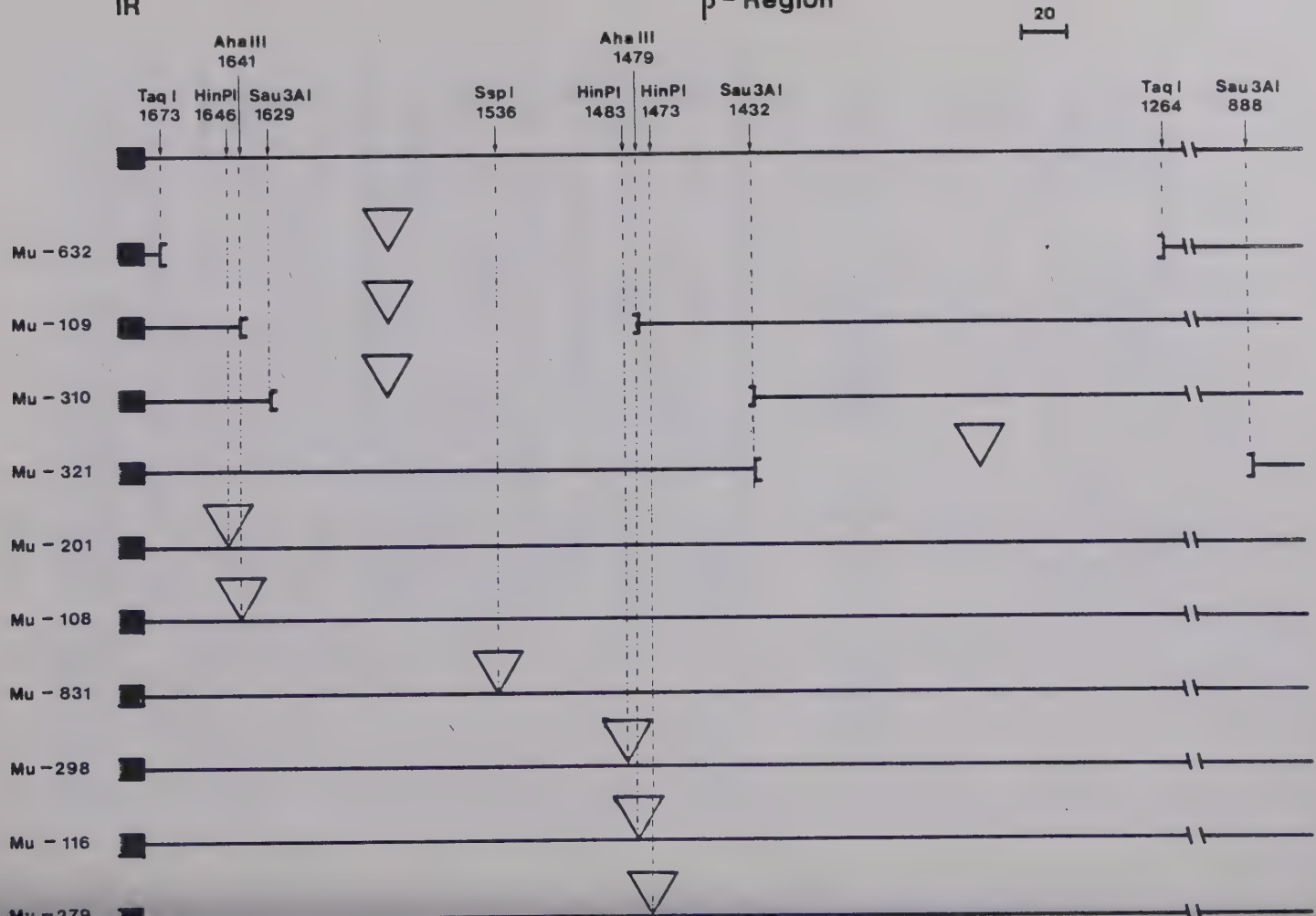
5.1.4 Inversion in Substitutionsmutanten der β-Region

Durch partielle Verdaus des Plasmids pMU901 mit den Restriktionsenzymen AhaIII, Sau3AI und TaqI wurden Substitutionsmutanten in der β-Region erzeugt (siehe Bild Nr.18). Da die Phagen gin⁻ waren, wurden sie komplementiert mit C600, der eine gin Quelle im Bakteriengenom trug, oder mit CSH50/pGM1, in dem gin plasmidkodiert vorlag. In den Phagenlysaten dieser Stämme konnte die Inversion durch Plattierung der G(+) bzw. G(-) Partikel auf den entsprechenden Indikatorstämmen, CSH50 bzw. E.cloacae, bestimmt werden. Der Quotient aus der Anzahl der Plaques auf E.cloacae und auf CSH50 ergab die Inversionsrate. In allen Mutanten konnte Inversion nachgewiesen werden, die Inversionsrate war allerdings abhängig von der Position der Mutation und der gin Quelle, die zur Komplementierung verwendet wurde.

Es konnten vier Substitutionsmutanten charakterisiert werden. Die TaqI Deletion in Mu-632 begann 6bp hinter dem IR (Pos.1673) und endete an Position 1264. Mu-109 und Mu-310 lieferten kleinere Deletionen zwischen den AhaIII- (Pos.1479-1641) bzw. den Sau3AI Stellen (Pos.1432-1629). In Mu-321 konnte eine weitere Sau3AI Deletion charakterisiert werden, die direkt im Anschluß an die Mu-310 Deletion lag (Pos.1124-1432).

Bild Nr.18: Substitutions- und Insertionsmutanten

Die Positionsangaben beziehen sich auf die rechte Anheftungsstelle von Mu, die Null gesetzt wurde; die Dreiecke stellen das Kanamycinresistenzfragment dar; die Klammern zeigen den Bereich der Deletion.


IR
p - Region
20
AhaIII 1641
AhaIII 1479
Taq I 1673
HinPI 1646
Sau3AI 1629
SspI 1536
HinPI 1483
HinPI 1473
Sau3AI 1432
Taq I 1264
Sau3AI 888
Mu - 632
Mu - 109
Mu - 310
Mu - 321
Mu - 201
Mu - 108
Mu - 831
Mu - 298
Mu - 116

Wie aus Tabelle Nr.1 zu ersehen ist, konnte in den Lysaten der C600 Lysogenen mit den Mutanten Mu-632, -109 und -310 keine G(-) Phagen nachgewiesen werden, während Mu-321 eine Inversionsrate von 10^{-5}/ml erreichte. In den Lysaten aus CSH50/pGM1 erreichten die Mutanten Mu-632, -109 und -310 eine Inversionsrate von 10^{-6} bis 10^{-7}/ml, während Mu-321 eine Inversionsrate von 10^{-3} bis 10^{-4}/ml erreichte. Das Inversionsverhalten von Mu-632, -109 und -310 auf der einen Seite und Mu-321 auf der anderen Seite zeigte, daß in den erstgenannten Mutanten Sequenzen deletiert wurden, die die Inversion des G-Segments beeinflussen. Da trotz des Verlusts dieser Sequenzen Inversion nachgewiesen werden konnte, mußte das deletierte DNA Segment keine essentiellen sondern nur stimulierende Sequenzen enthalten haben. Der Faktor 100, um den sich die Inversionsraten der drei im vorderen Bereich der β-Region liegenden Substitutionsmutanten von Mu-321 unterschieden, spiegelte die Aktivität dieser Sequenz wider.

Tabelle Nr.1: Inversionsraten der Substitutionsmutanten

	C600	CSH50/pGM1
Mu-632	10^{-9}	$1x10^{-6}$
Mu-109	10^{-9}	$2x10^{-6}$ - $1x10^{-8}$
Mu-310	10^{-9}	$1x10^{-6}$ - $1x10^{-8}$
Mu-321	$1x10^{-5}$	$2x10^{-4}$

5.1.5 Inversion in Substitutionsmutanten des G-Segments

Das Verhalten der Mutanten des β-Bereichs hatte gezeigt, daß rechts vom IR ein größeres DNA Segment zur Inversion des G-Segments notwendig war. Da nicht bekannt war, ob das DNA Segment links vom IR in der G(R) Region eine Fortsetzung fand, wurde eine gezielte Mutagenese dieses Bereichs durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pMU901, das die G(R) Region besaß, mit dem Restriktionsenzym HinPI partiell verdaut. Von den entstandenen Mutanten wurden die Substitutionsmutanten in den Phagen gekreuzt (siehe Bild Nr.19). Da die Deletionen die Schwanzfaser inaktiviert hatten, die notwendig war zum Infizieren von E.cloacae, konnte kein biologischer Test benutzt werden, um die Inversion nachzuweisen. Statt dessen wurde die Phagen-DNA isoliert und die Inversion des G-Segments durch Restriktionsenzymanalyse mit KpnI und EcoRV festgestellt. Ausgehend von der G(+) Orientierung des G-Segments, wurde das in der G(-) Orientierung auftretende KpnI-EcoRV Fragment als Nachweis der Inversion benutzt (siehe Bild Nr.20). Dieses Fragment, das für die verschiedenen Mutanten aufgrund der unterschiedlichen Deletionen eine unterschiedliche Länge aufwies, konnte auf dem Agarose Gel für die Mutanten Mu-212, -232 und -249 nachgewiesen werden (siehe Bild Nr.21). Aus der Intensität dieses Fragments konnte geschlossen werden, daß in diesen Mutanten zwischen den beiden Orientierungen des G-Segments Gleichgewicht bestand. Da aufgrund der HinPI Deletionen nur noch die äußeren 40bp der G(R) Region vorhanden waren, konnte die Inversionsstelle links vom IR am Übergang von G nach β nicht

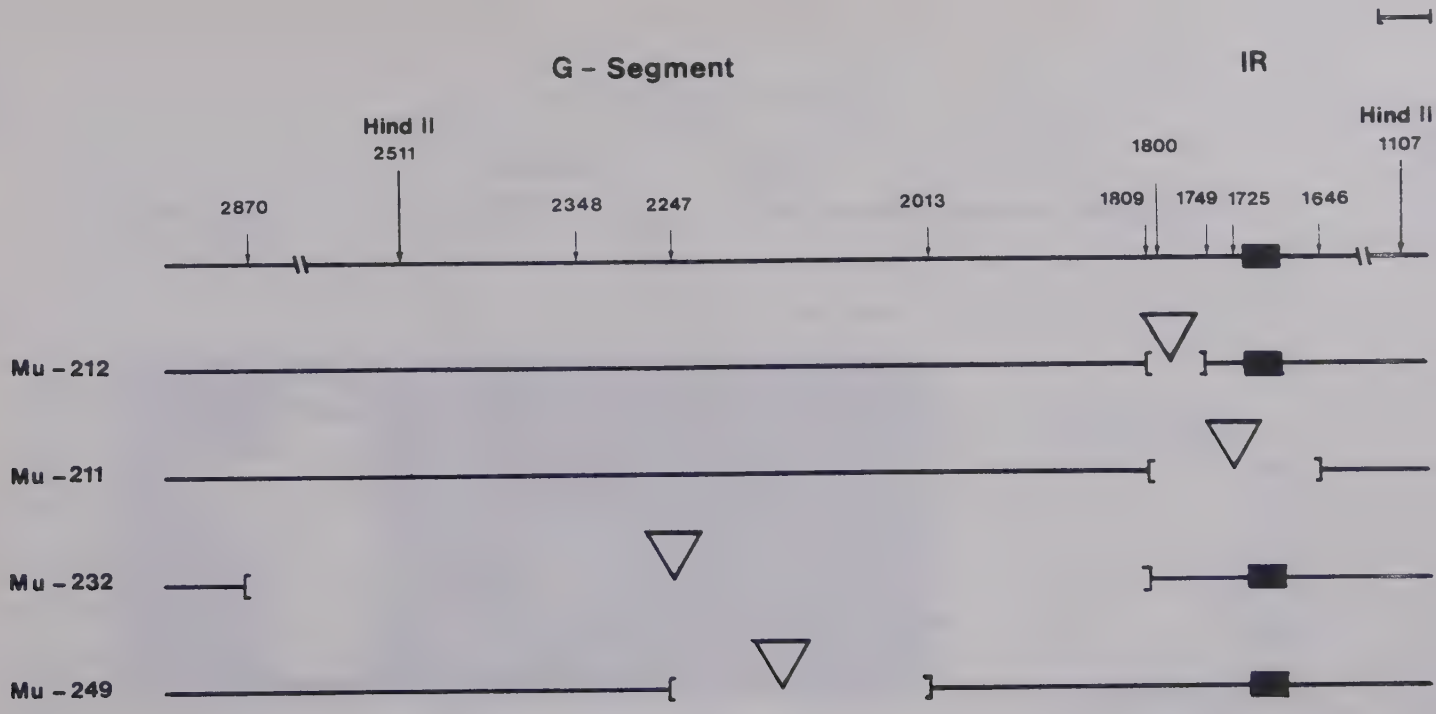
mehr als 40bp betragen.

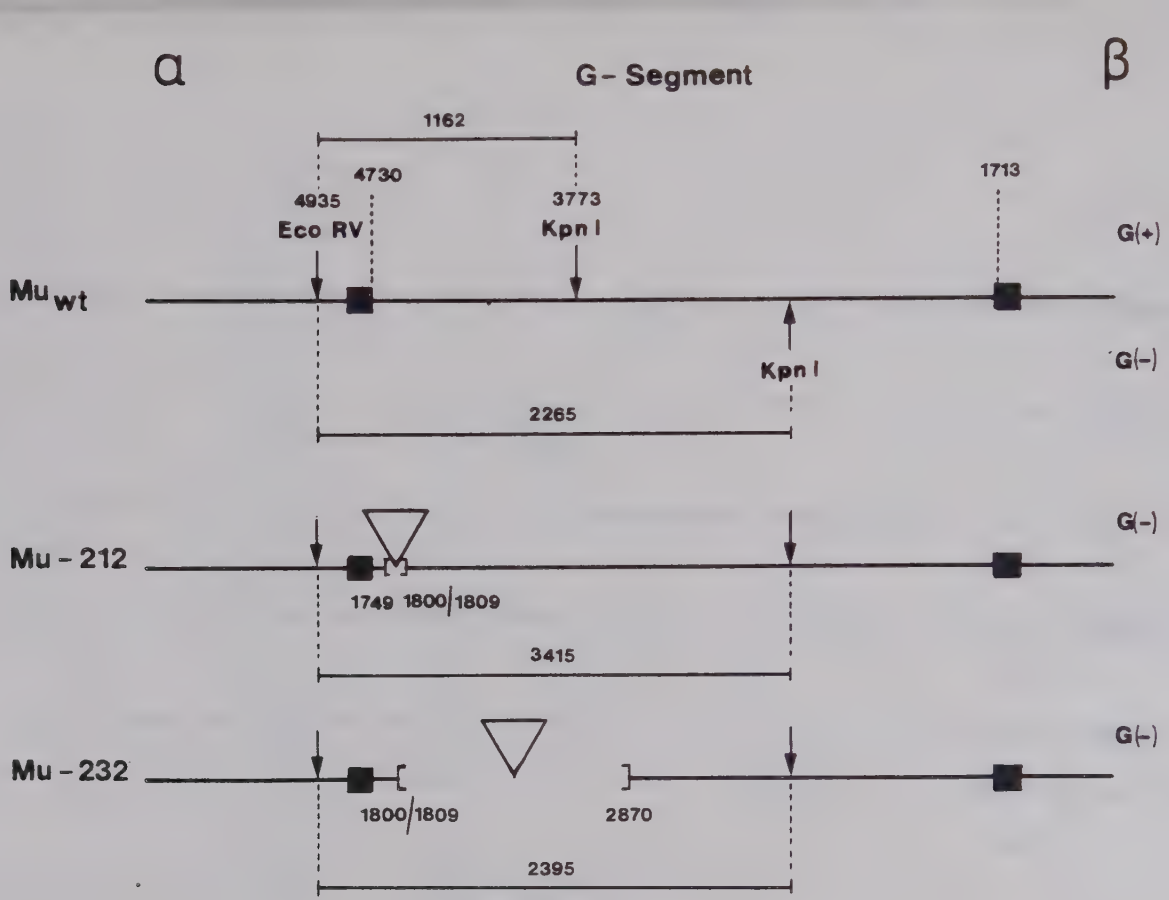
In der Mutante Mu-211 war durch Deletion des HinPI Fragments zwischen den Positionen 1800/1809 und 1641 der IR entfernt worden. In dieser Mutante konnten keine Inversionsbanden identifiziert werden.

Bild Nr.19: Karte der HinPI Mutanten

Die Positionsangaben der HinPI Schnittstellen beziehen sich auf die rechte Anheftungsstelle von Mu, die Null gesetzt wurde; die Dreicke stellen das Kanamycinresistenzfragment dar; die Klammern zeigen die Größen der Deletionen.

Bild Nr.20: Karte von Mu-212 und Mu-232


G - Segment
IR
Hind II
2511
Hind II
1107
1800
2870
2348
2247
2013
1809
1749
1725
1646
Mu - 212
Mu - 211
Mu - 232
Mu - 249


250
α
G- Segment
β
1162
4730
4935
Eco RV
3773
Kpn I
1713
G(+)
Mu wt
Kpn I
G(-)
2265
G(-)
Mu - 212
1749 1800/1809
3415
G(-)
Mu - 232
1800/1809
2870
2395

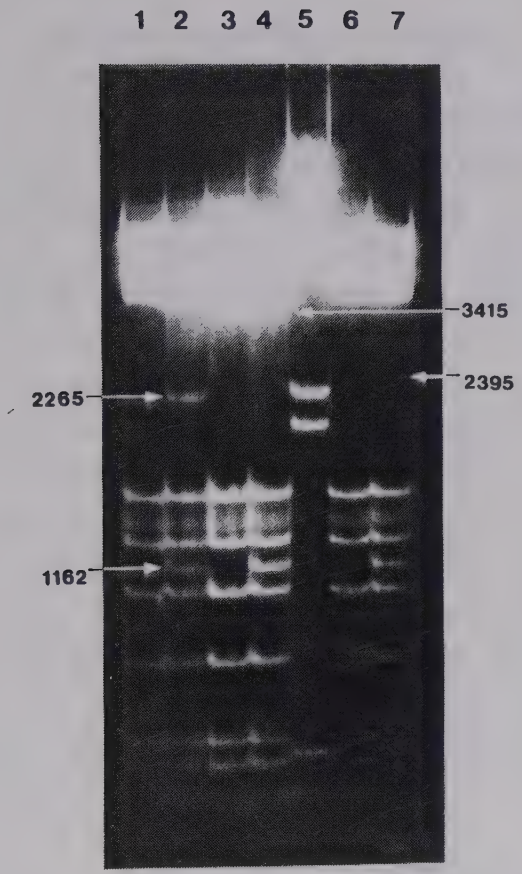


Bild Nr.21: Restriktionsenzymanalyse von Mu-212 und Mu-232 (1,4% Agarose, 50mA, 4h)

1: Mu/ EcoRV;
2: Mu/ EcoRV, KpnI;
3: Mu-212/ EcoRV;
4: Mu-212/ EcoRV, KpnI;
5: Größenmarker λ - HindIII;
6: Mu-232/ EcoRV;
7: Mu-232/ EcoRV, KpnI;

5.2 Charakterisierung der stimulierenden Sequenzen in β

Bei der Charakterisierung der HinPI Mutanten wurde die Mutante Mu-201 gefunden, die die Insertion in der vordersten HinPI Stelle der β-Region trug. Da in ihr das gin Gen nicht inaktiviert worden war, mußte dieser Phage zur Bestimmung der Inversionsrate nicht komplementiert werden. Da sich der erhaltene Wert nicht von dem von Mu unterschied, konnte angenommen werden, daß die stimulierenden Sequenzen durch die Insertion des Kan-Fragments um 1200bp verschoben werden konnten, ohne ihre Aktivität zu verlieren. Es handelte sich offensichtlich um eine vom IR distanzunabhängige Komponente der Inversionsstelle. Um die stimulierenden Sequenzen weiter charakterisieren zu können, wurden zum einen Insertionsmutanten getestet, die zwischen dem IR und der Sau3AI Stelle in Position 1432 lagen, und zum anderen wurden subklonierte Fragmente dieses Bereichs auf ihre stimulierende Wirkung geprüft.

5.2.1 Inversion in Insertionsmutanten in β

Die Insertionsmutanten, die zwischen dem IR und der Sau3AI Stelle lagen (siehe Bild Nr.18), wurden in Mu cIts62 gekreuzt. In den C600 Lysaten wurde eine Streuung der Inversionsrate beobachtet, wobei die Werte zwischen 10^{-5}/ml und 10^{-8}/ml lagen. Dies bedeutete, daß die Insertionen in den AhaIII Stellen in Mu-108 und Mu-116, in der SspI Stelle in Mu-831 und in den HinPI Stellen in Mu-298 und Mu-279 die Inversion des G-Segments verlangsamten. Dieses Ergebnis ließ

sich erklären durch die Existenz von mehreren stimulierenden Sequenzen, von denen höchstens eine durch die Insertionen inaktiviert worden war. Da von der AhaIII Stelle von Mu-108, in der die Insertion des Kan-Fragments eine Beeinträchtigung der Inversion bewirkte, zur HinPI Stelle von Mu-201, in der die Insertion keine Auswirkung hatte, nur ein Abstand von 5bp bestand, mußte die AhaIII Stelle die linke Grenze dieses die Inversion stimulierenden DNA Segments darstellen.

Tabelle Nr.2: Inversionsraten der Insertionsmutanten

	CSH50	C600	CSH50/pGM1
Mu-201	$3x10^{-2}$	nicht getestet	nicht getestet
Mu-108	$> 10^{-9}$	$2x10^{-5}$ - $3x10^{-8}$	$3x10^{-4}$
Mu-831	$> 10^{-9}$	$5x10^{-6}$ - $3x10^{-8}$	$3x10^{-4}$
Mu-298	$> 10^{-9}$	$5x10^{-6}$ - $2x10^{-7}$	$2x10^{-4}$
Mu-116	$> 10^{-9}$	$5x10^{-6}$ - $1x10^{-8}$	$1x10^{-3}$
Mu-279	$> 10^{-9}$	$1x10^{-5}$ - $1x10^{-7}$	$2x10^{-3}$
Mu-321	$> 10^{-9}$	$1x10^{-5}$ - $1x10^{-6}$	$2x10^{-4}$

Der Unterschied im Inversionsverhalten zwischen den Mutanten Mu-201 und Mu-108 zeigte sich auch in den galK Plasmiden. Im bereits beschriebenen Plasmid pGS3201, das das EcoRI Fragment der Mutante pMU901 HinPI(1646)::Kan 101 trug (siehe Bild Nr.16), konnte effiziente Rekombination nachgewiesen werden, aufgrund derer bereits in der Einzelkolonie eine Mischung aus galK$^+$ und galK$^-$ Plasmiden vorlag und daher auf McConkey Gal Ap Platten nur rote Einzelkolonien gefunden werden konnten. Wurde das EcoRI Fragment ersetzt durch das entsprechende Fragment der Mutante pMU901 AhaIII(1641)::Kan 8, so konnten in N100 mit dem Plasmid pGS5205, in dem die IRs eine antiparallele Orientierung besaßen, ca. 25% weiße Einzelkolonien gefunden werden, die wieder zu roten Einzelkolonien revertieren konnten. Dies bedeutete, daß in diesem Plasmid die Rekombination deutlich beeinträchtigt war, obwohl auch dieses Plasmid gin$^+$ war. In pGS5201, in dem die IRs eine parallele Anordnung besaßen, wurden 1% weiße Einzelkolonien gefunden, in denen der Bereich zwischen den IRs deletiert worden war.

5.2.2 Inversion von G(-) nach G(+)

Des weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob die Orientierung des G Segments einen Effekt auf das Inversionsverhalten der verschiedenen Mutanten ausübt. Im bisherigen Inversionstest wurde von G(+) Prophagen ausgegangen, deren Inversion zu G(-) Phagen bestimmt wurde. Um umgekehrt die Inversionsrate vom G(-) Prophagen zum G(+) Phagen messen zu können, wurden lysogene E.cloacae konstruiert, deren Lysate auf C600r$^-$m$^+$/pGM1 titriert wurden. Die G(-) Phagen, die un-

spezifisch ins Bakterium gelangt waren, konnten durch die bakterielle Inversionsfunktion in C600 oder durch das plasmidkodierte gin komplementiert werden. Dadurch konnten die G(-) Phagen zu G(+) Phagen invertieren, die im weiteren Verlauf in der Nachbarschaft liegende Bakterien infizieren konnten, wodurch Plaques entstanden. Es wurde ein r^- Stamm benutzt, um die Restriktion der G(-) Phagen durch das E.coli K12 System auszuschließen. Der Quotient aus der Anzahl der Plaques auf C600r^-m^-/pGM1 zur Anzahl der Plaques auf E.cloacae ergab die Inversionsrate der G(-) Phagen. Diese spalteten die Mutanten der β-Region in zwei Klassen auf. Alle Insertionsmutanten und die Substitutionsmutante Mu-321 erreichten eine Inversionsrate von 10^{-3}/ml, während die Substitutionsmutanten Mu-109 und Mu-310 nur eine Inversionsrate von 10^{-7}/ml erreichten. Dieses Muster war auch bei der pGM1-Komplementierung der G(+) Phagen aufgetreten. Daraus konnte geschlossen werden, daß die Orientierung des G-Segments keinen Einfluß auf das Inversionsverhalten der Mutanten hatte.

5.2.3 Dosiseffekt

Bereits bei der Komplementierung der Substitutionsmutanten war aufgefallen, daß pGM1 eine höhere Inversionsrate erzielte als C600 (siehe Tabelle Nr.1). Dies wurde auf einen Dosiseffekt zurückgeführt, da der in einer Kopie vorliegenden genomischen gin Quelle von C600, 15-20 Kopien der plasmidkodierten gin Quelle auf pGM1 gegenüberstanden. Dies wiederum bedeutete, daß der Verlust der stimulierenden Sequenzen durch hohe Gin Dosen kompensiert werden konnte. Tat-

sächlich wurde die in den C600 Lysaten festgestellte Beeinträchtigung der Inversionsrate der Insertionsmutanten in den CSH50/pGM1 Lysaten nicht mehr gefunden (siehe Tabelle Nr.2).

5.2.4 Heterologe Komplementierung

Die Substitutionsmutanten des β -Bereichs wurden durch Cin, dem Inversionsenzym des Phagen P1, und durch Hin, dem Inversionsenzym von S.typhimurium, komplementiert. Geht man davon aus, daß die Plasmide pGM1 (gin), pGP2 (cin) und pMS8 (hin) die gleichen Mengen an Inversionsenzymen expremieren, kann man die Inversionsraten der Substitutionsmutanten vergleichen, die mit den verschiedenen Inversionsfunktionen erreicht wurden. Wie aus Tabelle Nr.3 zu ersehen ist, erreichte Cin eine ähnliche Inversionsrate wie Gin, während Hin eine geringere Aktivität zeigte. Die Benutzung dieser Mutanten ermöglichte somit eine Unterscheidung der Aktivitäten der verschiedenen Inversionsenzyme.

Tabelle Nr.3: Inversionsraten von gin$^-$ Mutanten nach Komplementation mit Cin und Hin

	CSH50/pGP2	CSH50/pMS8
	Cin	Hin
Mu-108	$1x10^{-4}$	$7x10^{-6}$
Mu-109	$1x10^{-7}$	$> 10^{-9}$
Mu-310	$1x10^{-7}$	$> 10^{-9}$
Mu-298	$2x10^{-4}$	$1x10^{-4}$ - $1x10^{-6}$
Mu-321	$7x10^{-5}$	$4x10^{-4}$

5.2.5 Stimulierung der Inversion durch Sequenzen der β-Region

Das Verhalten der Substitutions- und Insertionsmutanten legte den Schluß nahe, daß mehrere Sequenzen in der β-Region die Stimulierung der Inversion bewirken. Um ein genaueres Bild der Verteilung der stimulierenden Sequenzen zu bekommen, wurden Subfragmente des AhaIII Fragments, das alle oder zumindest die meisten der stimulierenden Sequenzen beinhaltete, und ein Oligodeoxynukleotid auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die Inversion des G-Segments in der *inv*$^-$ Mutante Mu-310 zu stimulieren.

Die Fragmente wurden unter gleichzeitigem Verlust des Kanamycinresistenzfragments in das Plasmid pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10ΔPstI inseriert. Dadurch war bei der Kreuzung der Mutanten in den Phagen keine Selektion auf das Antibiotikum mehr möglich. Daher mußte eine kompliziertere Strategie der Kreuzung eingeschlagen werden. Der Phage Mu-518 besaß eine Kan-Insertion in der BclI Stelle in Position 888, aufgrund derer das Modifikationssystem (*mom*) des Phagen inaktiviert wurde. Demgegenüber besaß die Mutante pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10 noch das intakte *mom* Gen. Daher sollte die Rekombination zwischen dem Plasmid und dem Phagen Mu-518 zu *mom*$^+$ Phagen führen. Erfolgt die Rekombination in dem *r*$^-$*m*$^-$ Stamm RR1, so besitzen nur *mom*$^+$ Phagen eine modifizierte DNA. Diese besitzen gegenüber den *mom*$^-$ Phagen in P7 Lysogenen einen Wachstumsvorteil, da sie vom Restriktionssystem des Phagen P7 nicht restringiert werden.

Folglich wurde im Stamm RR1, der das zu kreuzende Plasmid

enthielt, ein Lysat mit dem Phagen Mu-518 gemacht. Da das plasmidkodierte mom durch den Phagen induziert worden war, waren alle Phagen dieses Lysats modifiziert. Daher wurde die Mischung der Phagen nochmals auf RR1 vermehrt. Die Phagen dieses Lysats konnten aufgrund ihrer Modifizierung unterschieden werden. Während Lysate aus Stämmen, die nur mom$^-$ Phagen enthielten, auf CSH50(P7) einen Phagentiter von 10^2/ml erreichten, lag dieser Wert für Lysate aus Stämmen, die das mom$^+$ Plasmid trugen und die aus einer Mischung aus mom$^-$ und rekombinanten mom$^+$ Phagen bestehen sollten, um Faktor 100 höher.

Tabelle Nr.4: Phagentiter auf RR1 und CSH50(P7) (pro ml)

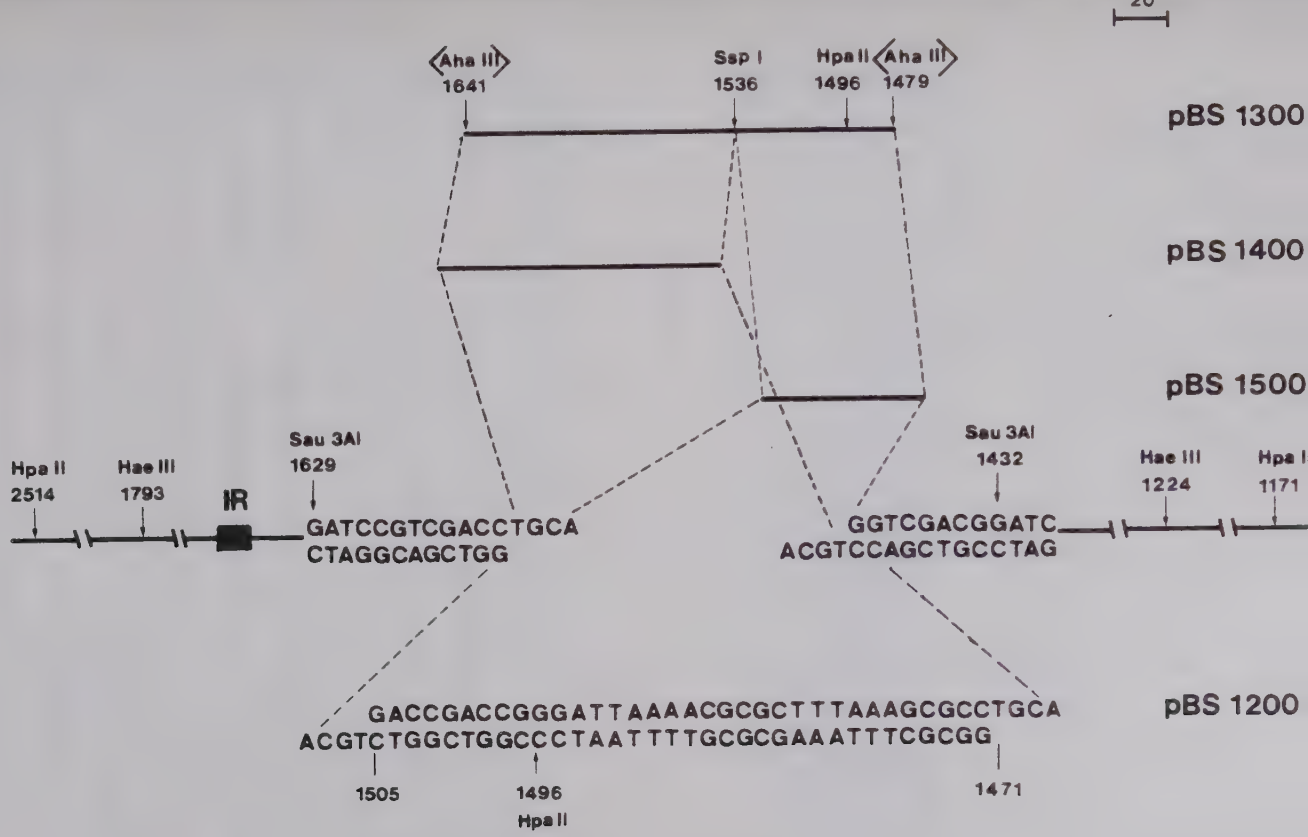
	RR1	CSH50(P7)
RR1(Mu-518)	$1x10^8$	$> 10^2$
RR1/pBS201(Mu-518)	$2x10^8$	$1x10^8$
RR1/pBS209(Mu-518)	$6x10^7$	$1x10^7$
RR1/pBS227(Mu-518)	$3x10^8$	$2x10^8$
RR1(Mu-518xpBS201)	$5x10^8$	$4x10^4$
RR1(Mu-518xpBS209)	$8x10^8$	$8x10^4$
RR1(Mu-518xpBS227)	$5x10^8$	$3x10^4$

Die Phagen wurden vereinzelt und weiter charakterisiert. Da in den rekombinanten *mom*$^+$ Phagen die Kanamycin Insertion in der BclI Stelle herausgekreuzt worden sein mußte, wurde zunächst nach Kn^S Phagen gesucht. Da der Ausgangsphage *gin*$^+$, die Plasmide mit den verschiedenen Insertionen aber *gin*$^-$ waren, lieferte ein *gin*-Test die *gin*$^-$ Phagen, die neben *mom* auch den *gin* Bereich rekombiniert hatten. Mit diesen wurden C600 und CSH50/pGM1 lysogenisiert und deren Inversionsrate bestimmt.

Als Kontrolle diente der Phage Mu-1201, der durch Kreuzung von Mu-518 mit dem Plasmid pUC7-EcoRI MupMU901 Sau3AI(1432-1629)::MCS 10 hervorgegangen war. Nach Komplementierung mit C600 konnten in dem resultierenden Lysat keine G(-) Phagen nachgewiesen werden.

Bild Nr.22: Konstruktion der Plasmide pBS1200-1500

Die Positionsangaben der Restriktionsschnittstellen beziehen sich auf die rechte Anheftungsstelle von Mu, die Null gesetzt wurde; die in eckige Klammern gesetzten Restriktionsschnittstellen wurden bei der Ligation nicht restauriert. Die im Vektor dargestellte Sequenz stellt den Linker dar, der bei der nachträglichen Entfernung des Kanamycinresistenzfragments zurückbleibt.


20
Aha III
1641
Ssp I
1536
Hpa II
1496
Aha III
1479
pBS 1300
pBS 1400
pBS 1500
Sau 3AI
1629
Hpa II
2514
Hae III
1793
IR
GATCCGTCGACCTGCA
CTAGGCAGCTGG
Sau 3AI
1432
GGTCGACGGATC
ACGTCCAGCTGCCTAG
Hae III
1224
Hpa I
1171
GACCGACCGGGATTAAAACGCGCTTTAAAGCGCCTGCA
ACGTCTGGCTGGCCCTAATTTTGCGCGAAATTTCGCGG
pBS 1200
1505
1496
Hpa II
1471

Insertion des AhaIII-Fragments

Das AhaIII-Fragment wurde mit PstI Linkern versehen und in pBR322 inseriert und charakterisiert. Aus diesem Plasmid wurde das AhaIII Fragment mit PstI ausgeschnitten und mit der mit PstI linearisierten Substitutionsmutante pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10ΔPstI ligiert. Der Nachweis des Fragments erfolgte durch Restriktionsenzymanalyse mit HaeIII (siehe Bild Nr.23), die Bestimmung der Orientierung mit HpaII (siehe Bild Nr.24). Die Inversionsraten der rekombinierten Phagen lagen zwischen 10^{-6} und 10^{-7}/ml. Die Orientierung des AhaIII-Fragments zeigte keinen Effekt auf die Inversion des G-Segments.

Subklonierung des AhaIII-Fragments

SspI zerteilte das AhaIII-Fragment in ein 105bp und ein 57bp großes Fragment. Auch diese Fragmente wurden mit PstI Linkern versehen, in die PstI Stelle von pBR322 kloniert und anschließend in pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10ΔPstI inseriert. Die Plasmide der Serie pBS1400 enthielten das AhaIII-SspI-Fragment, während in pBS1500 das kleinere SspI-AhaIII-Fragment inseriert wurde. Der Nachweis der Insertionen erfolgte durch Verdau mit HaeIII (siehe Bild Nr.23). Mu-1403 und Mu-1404 erreichten in C600 eine Inversionsrate von 10^{-6} bis 10^{-7}/ml, die den Werten entsprach, die mit dem AhaIII-Fragment erzielt worden waren. Eine zweite Klasse von Mutanten ergab sich aus dem Inversionsverhalten von Mu-1401 und Mu-1402, die nur einen Wert von

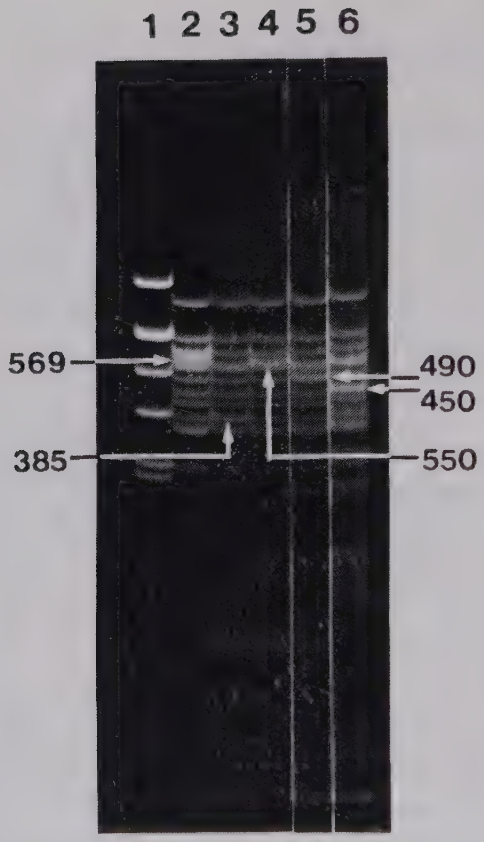


Bild Nr.23: pBS1300/ 1400/ 1500 HaeIII (2% Agarose, 75mA, 2h)

1: pBR322/ AluI;
2: pMU901/ HaeIII;
3: pBS1307/ -"- ; durch die Deletion des Sau3AI Fragments in pMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10ΔPstI verkleinerte sich das 569bp Fragment in pMU901. (Spur 2) auf 385bp (Spur 3, Doublette)
4: pBS1316/ -"- ; durch die Insertion des AhaIII Fragments vergrößerte sich das 385bp Fragment (Spur 3, Doublette) auf 550bp (Spur 4).
5: pBS1401/ -"- ; durch die Insertion des AhaIII-SspI Fragments vergrößerte sich das 385bp Fragment (Spur 3, Doublette) auf 490bp (Spur 5, Doublette).
6: pBS1505/ -"- ; durch die Insertion des SspI-AhaIII Fragments vergrößerte sich das 385bp Fragment (Spur 3, Doublette) auf 450bp (Spur 6, Doublette).

10^{-9}/ml erreichten. Aufgrund des asymmetrischen XhoII Schnitts innerhalb des AhaIII-SspI Fragments konnten für die Plasmide pBS1403 und 1404 auf der einen Seite und pBS1401 und 1402 auf der anderen Seite die verschiedenen Orientierungen des Fragments identifiziert werden. Daraus ergab sich, daß das AhaIII-SspI Subfragment nur in einer Orientierung fähig war, die Inversion des G-Segments zu stimulieren.

Auch mit dem kleinen SspI-AhaIII-Fragment konnte eine Stimulierung der Inversion nachgewiesen werden. Zwar lag die Inversionsrate nur zwischen 10^{-8} und 10^{-9}/ml, jedoch konnte ein signifikanter Unterschied zu Mu-1201 festgestellt werden, der kein Subfragment enthielt und in dem keine G(-) Phagen nachweisbar waren.

Zwischen den beiden Orientierungen des Subfragments, die durch Verdau mit HpaII bestimmt wurden (siehe Bild Nr.24), konnte kein Unterschied in der Inversionsrate festgestellt werden.

Insertion eines Oligodeoxynukleotids

Die Subklonierung des AhaIII Fragments lieferte einen weiteren Beweis dafür, daß im gesamten Bereich des AhaIII Fragments stimulierende Sequenzen liegen mußten. Eine Möglichkeit der weiteren Eingrenzung dieser Sequenzen bestand in der Klonierung von Oligodeoxynukleotiden. Daher wurde ein Oligodeoxynukleotid synthetisiert, das die Mu-Sequenz zwischen den Positionen 1471 und 1505 besaß. Das Oligodeoxynukleotid wies an den Enden einen 3'-Überhang auf,

so daß es in die PstI Stelle von pUC7-EcoRI MupMU901 Sau3AI (1432-1629)::Kan 10 inseriert werden konnte. Die Insertion und die Orientierung des Oligodeoxynukleotids wurde durch Restriktionsenzymanalyse mit HpaII bestimmt (siehe Bild Nr.24). Nach der Kreuzung in Mu-518 wurde in C600 eine Inversionsrate von 10^{-8}/ml gemessen.

Tabelle Nr.5: Inversionsraten derPhagen mit subklonierten Fragmenten nach der Komplementation mit C600

Mu-1201	$> 10^{-9}$
Mu-1209	$2x10^{-8}$ - $6x10^{-8}$
Mu-1227	$1x10^{-8}$ - $5x10^{-8}$
Mu-1316	$6x10^{-6}$ - $3x10^{-7}$
Mu-1318	$5x10^{-6}$ - $3x10^{-7}$
Mu-1401	$3x10^{-9}$
Mu-1403	$3x10^{-6}$ - $7x10^{-7}$
Mu-1502	$3x10^{-8}$ - $2x10^{-9}$
Mu-1504	$1x10^{-8}$ - $7x10^{-8}$

Bild Nr.25: DNA Sequenz derβ -Region, des G Segments und eines Teils der angrenzenden α-Region

Die Nummerierung der Sequenz beginnt bei der rechten Anheftungsstelle von Mu. Die Restriktionsschnittstellen sind angegeben, die für die Konstruktion und Kartierung der Mutanten notwendig waren.

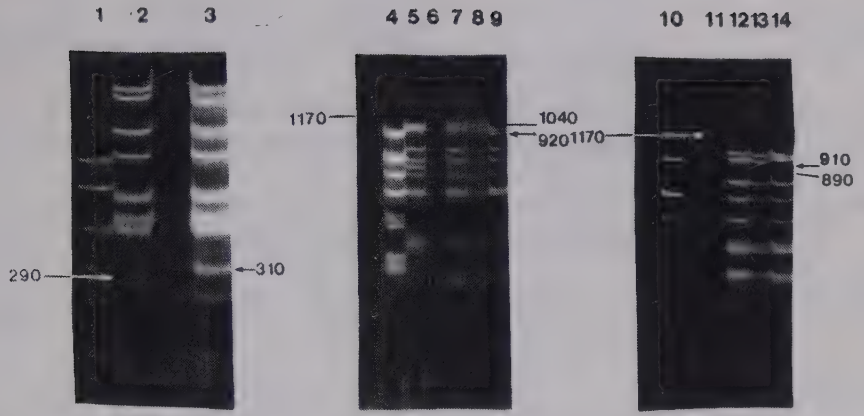


Bild Nr.24: pBS1200/ 1300/ 1500 HpaII

1-3: pBS1200/ HpaII (2% Agarose, 75mA, 2,5h)
1: pBR322/ HpaII;
2: pBS1209/ -"- ;
3: pBS1227/ -"- ; durch die Insertion des 39bp großen Oligodeoxynukleotids wurde das 1170bp große HpaII Fragment aus pUC7-EcoRI MupMU901 Sau3AI(1432-1629)::Kan 10 abhängig von der Orientierung zerlegt in ein 930bp und in ein 290bp Fragment (Spur 2) bzw. in ein 910bp und ein 310bp Fragment (Spur 3).
4-9: pBS1300/ HpaII (1,7% Agarose, 75mA, 2h)
4: pBR322/ AluI;
5: pMU901/ HpaII;
6: pBS1307/ -"- ;
7, 8: pBS1311, 1316/ -"- ;
9: pBS1317/ -"- ; abhängig von der Orientierung des AhaIII Fragments wurde das 1170bp große HpaII Fragment (Spur 6) zerlegt in die Fragmentpaare 1040/ 290bp (Spur 7, 8) bzw. 920/ 410bp (Spur 9).
10-14: pBS1500/ HpaII (2% Agarose, 75mA, 2h)
10: pBR322/ AluI;
11: pBS1307/ HpaII;
12, 13: pBS1502, 1503/ -"- ;
14: pBS1504/ -"- ; abhängig von der Orientierung des SspI-AhaIII Fragments wurde das 1170bp große HpaII Fragment (Spur 11) zerlegt in die Fragmentpaare 890/ 310bp (Spur 12, 13) bzw. in die Fragmentpaare 910/ 290bp (Spur 14).

```
                HinPI
1   TGAAGCGGCGCACGAAAAACCCGAAAGCGTTCACGATAAATGCGAAAACTTTAGCTTT

                                                        Sau3AI
61  CGCTTCAAATGAAACAGATGTATTAATTACTGCTTTTTATTCATTACATGGGGATCAC

121 AGGGTATGGCTGAACCTTGAATAGTTTGGTATTTAGCCGCTTCCTTGCTCGTTTGTTC

181 GAATCTGATGTAGCGATACTGATTAAATTTGTGTACCACGGCACGCTCTTTATTAGCC

241 TAAATACACGCCTCGTTGTCCACCTCGCTTAATCGCGTTCATCGTTATCTCGTGATAC

                                                          TaqI
301 CTCACCATCCAGCTCGTAGAACGTACTTTCATGACTGCCAATAAAATCAAAATTCGAC

                    HinPI
361 CTGATACACAACGCCTGCGCGTCCGCAGCGTTCATCTGCAAAGGACTGAACCCACTCC

                                          Sau96I
                                  HinPI   HaeIII
421 TGACGGATACAGTAATCTGATAACTTTCAGCGCGTAGCTGATGGCCCCGTGATTCAGAC

                                                      HpaII
481 GCGGGGCATGTCGTCGTGTAGCCACATGCGGTTCAACTCCATATAGCCCCGGTTATCC

541 TTCAAGCACGACACGACGACCTGAGTTGGGGTTAAGGGCATATCCCCACTGGAGAACC

        Sau3AI
601 AACCAGATCGCGTCCGCTGAATACCCCCAGGTGAAGGTAAGAGTTATTCACAAAACGC

                                  Sau96I
                                  HaeIII
661 GGAATAGTGCTTTGTCTGAATAATTGTGCGGGGCCAGCCAGCAGGATATGGTTTCAACC

                                  HaeIII
721 CAGCTCCTTTGAACCATAGCCAACAATCTGGCCTTCATACTCAATAACGCACGGTTTC

781 CAGAATGCGTGATTTTTTCTCTTTTCCCACAATGTTTCTCCGTGGGATGCTCGCAGGC

                                                      BclI
                                                    Sau3AI
841 TCAGCATTATGATGTGACGTTTGCAACGCGGACACCTGATTTCAATGTGATCAAAGGA
```

```
                                                    TaqI
961  TGCATCAATTCGCCACTATCTTAAAAAACATCATGGGTCGAGTGTGGTTATTGGGGCATA

          TaqI                 TaqI                TaqI
           Sau3AI              Sau3AI               Sau3AI                HinPI
1021 ATCGATCTGTATTACCGATCGATTTAATTGATTCGATCGTCGTTTTCTATATGCGCTCGT

                                                  Sau96I
                                  HindII          HaeIII        Sau3AI
1081 TTCGCGGGGTGTTTTTTATACAGAGTTGACAGGGCCACATCGTAGATCAATGCAACCTGC

                                                 HpaII
                                                  HaeIII
1141 TTGCGGGGGATTCCTTGTGCTAATAAACGCCCGGCCTGCTCCCATTCCGCTTTGGTTAGT

                                  HaeIII
1201 TTAGGTGGTCGCCCACCAATACGGCCTTTATTTCTGGCGGCAGCAAGTCCAGCCATCGTT

        TaqI
1261 CGCTCGATAATTAGTTCTCGTTCCATTTCAGCCAGGGCACCCATAACGTGGAAGAAAAAA

1321 CGCCCCATTGGAGATGACGTATCAATACTGTCAGTAAGACTGCGAAAATTAATCCCTCGC

                                                              Sau3AI
1381 TCTCGTAATTCCCCTACGAGAGAAATCAAATGTTTCATGCTTCGCCCGAGGCGATCCAGT

                                                 AhaIII
                                        HinPI      HinPI          HpaII
1441 TTCCAGACAACCAGTGTGTCACCTTTTTGAAGGCGCTTTAAAGCGCGTTTTAATCCCGGT

                                                SspI
1501 CGGTCTGTCCTTGTTCCGCTTAATTTATCTTCAAATATTTGTTCACATCCTGCACAAACA

1561 AGAGCGTTTCGTTGCAGGTCTGTATTCTGGTCATTTGTTGATACCCTTACATAGCCAATC

          XhoII
          Sau3AI     AhaIII HinPI                                  TaqI
1621 AGCACTCTGGATCTCCTGTTTAAAAGCGCCAATCATGCCATGCGTGCCAAAATCGACCA

          IR
                                                              HinPI
1681 TATCCAAAACCTCGGTTTACAGGAAACGGTAAATCAGGCTTCTGGCGCATTACAGCAAAA

                                                            Sau96I
          HinPI                                       SspI  HaeIII
1741 CCAGAACGGCGCAGATATTCCAGGAAAAGATACCTTCACCAAAAATATTGGGGCCTGTCG

     HinPI    HinPI        SspI
1801 CGCATATAGCGCATGGCTGAATATTGGTGGCGATAGTCAGGTCTGGACAACCGCACAATT

1861 TATTTCGTGGCTGGAGAGTCAGGGGGCATTTAACCATCCTTACTGGATGTGCAAAGGCTC
```

SspI
1921 ATGGGCTTATGCAAACAATAAGGTCATTACAGATACAGGTTGCGGAAATATTTGTCTTG

HinPI
1981 AGGTGCTGTGGTGGAAGTTATTGGCACTCGCGGCGCAATGACCATACGCGTTACTACGC

2041 GAGTACGTCCAGCGGCGGCGGAATCACTAACGCTCAATTCACTTATATTAATCATGGTG

2101 TGCTTATGCTCCTGGCTGGCGACGAGACTACAACACGAAAAACCAGCAGCCTGCATTTG

2161 TTTAGGACAAACAGGAAGCACTGTCGGAAATGATAAAGCTGTTGGCTGGAACTGGAATA

TaqI
SspI HinPI
2221 CGGGGTCTATAACGCAAATATTGGTGGCGCATCGACATTAATCCTCCACTTCAATATGA

2281 TACGGGGAGTTGCCCTGCCGTACAGTTCCGTGTGAATTACAGGAACGGCGGTATTTTTT

HinPI TaqI
2341 TCGTTCAGCGCGTGATGGTTACGGATTCGAAGCTGACTGGTCAGAAATTTACACCACAA

2401 ACGTAAGCCATCAGCGGGAGATGTTGGTGCATATACGCAGGCAGAATGTAACTCAAGGT

HpaII
2461 TATTACAGGTATTCGTCTTGGCGGTCTGTCATCTGTTCAGACATGGAATGGTCCCGGCT

HindII
2521 GTCTGACAGGTCAGGTTATGTCGTTACGGGTTCAGTTAACGGAAACCGTGATGAATTAA

HaeIII
2581 TGATACAACTCAGGCAAGGCCAATTCAGTATTGCATTAATGGAACGTGGTATAACGCGG

SspI
2641 GAGTATTTAATTATGATGCACTTAAAAAATATTACTGCTGGCAACCCTAAAACAAAAGA

2701 CAATACCAGCTAACGAAACAATTTAACATCAAATGGCTTTATACAGAGGATGGGAAAAA

2761 TGGTATGAGGAACAAAAGAACTTTCAGCCTGATACGTTGAAAATGGTCTATGACCACAA

HinPI
2821 GGCGTTATTATTTGTATTGAAAAGGATGTTTCAGCAATTAATCCAGAAGGCGCAAACGT

2941 AAAGATGGTGTAGTGATAAAGCGAACTTATACCGAGGAAGAGCAGAGGCAACAAGCGGAA

3001 AATGAAAAGCAAAGCCTGCTACAGCTCGTCAGGGATAAAACACAGCTATGGGACTCACAG

3061 CTACGGCTGGGCATCATTTCCGACGAGAATAAACAAAAATTAACAGAGTGGATGCTCTAC

HinPI TaqI
3121 GCGCAGAAGGTCGAATCCACAGACACCTCCAGCCTGCCAGTAACGTTTCCAGAACAACCA

Sau96I Sau96I
HaeIII HaeIII HaeIII
3181 GAATGAGAGAAGGCCCGCTATCGGGCCTTAATTTTTATTCAGGCTTTTGTGGCCATTCGG

3241 GATTTGCCGTATCCACACGGCTGACCAGAACACTGTAGCGTTCCCATGACTCCAGTCGTG

HinPI
3301 CGCGTTCCTCATCCGTCGCCATATTCAGCCTGACAGCGCGTTCCAGCGGCTGGATGACTG

HaeIII
3361 ATTCAGCTTCGGAAAGCAATGCGGCCTTTTGTGATTCGGCTTGTTGTTGCTGTTCGTCTG

3421 CCGTATAAATCCGTTTAACTACAGCTCCATCCTTAAACATCCACTTTCCTGAATCATCAG

3481 CGCGGCGGTTGGCTGTTATATCTGGAATCTCAACGACGCTAAAGCCTTCGGGATTAAGCG

SspI
3541 TTGAGGCATCTTTGGTTATGGCAACAATAATATTATTTTCGTCGTATACAATCTTTATGG

Sau96I
3601 TGTCGTCCTGAAAGTTATTTACTTCTTCATACCAGTTTTTCCCGTCTTCGGACCATAACC

3661 AGATAACATCAAAATTCTTTGTTAGCTGATATTGCTCTTTAGTTTTTGGATTTTCTGACT

HinPI KpnI
3721 TAATGTTTTTCAGATGCATCATAATCAGGCGCTCGCTACATTATACCAGGTACCGTTGAT

HpaII
3781 ATTCTTCTGAACCGGACGGATATAAACCTTGTCATCCCCTCCCTGCATTTCCCAGTCGCC

HpaII
3841 ATTGGTATGAAAACCTGTAATAACATGACCGGATGACGCCTTGTAATCACGAGACAAGCC

3901 GTCAGTCAGTGACTGAGTTCCCAGCCGAACGTCACGCACGTAGCGGGAGTCAAAGTTG

HpaII
3961 GTAATTTCCCGGAATGACCTGAGCACCGCATAACCAGTTTCCGTTATTATCCATGTAC

4021 CTGACCATCGGTGCCATTGGCTGTCCTTGAGTTATTAATCATGTAGATGCCAAATTGC

4081 ATTTCCCAGACCGCCAATCATAAATTTGCGGTCGGCGTGATTCTGGCGAAGCAACGCC

HinPI HinPI
4141 AGCGCTATCAGTGTTAACTATATTTTTCCCAAAGATAGCGTTGTTATCGCGCATCTGA

4201 CCACATACCATTACTGCTGTTAATAGCAAAACGGTCTGAAAGTGTATCCCCTGAAACA

TaqI HinPI HaeIII
4261 AAGACCACGCCCCATCGAAACAGCGCCAGTAGCGTTATTAATCCATAATGGCCTTAAT

HpaII
4321 GTTATAAGTCCCCATGTTGTCACCGGAGTTTGTCAACATGAAGTATGTATTTGAACCA

HaeIII
4381 ATTACGAATAAAGAATCCGTAATTACCATAAGCAATACGGAGGCCGTTTGCTGATTTT

4441 TATGACTTCGCCATTTACAATGGCATTGACAAGAACAGACAAAGCATCCCATTTAAGA

SspI
4501 CATCAGGTCTTTTGTTGTGGTGCTTTGTTTGCTTCTCCATTTGAAATATTCATTGCCG

AhaIII
4561 GTCGCCTGTTTCAAACCACATGTATGAATCAGTGTCGCTGTCGGCATCATTTTTAAAT

TaqI
4621 AATCTTTGCCCAGTCAGTATTTCGAATCCAGGCAAGGATTGAGTCGTTTTCAAAAGTA

HpaII
4681 CCCACCGGACAAGGTATCGCCATTCTTTTGCACGGCGTTCCTAGCCCTGTTTACCGTT

IR
4741 CTGTAAACCGAGGTTTTGGATAAACAGCGGCTTATTGGGAATATCTGCTCCGTTCCGC

4801 TTTTGCCAGACGGGCATTGGCATTATCCATTGCAATTTTCACCGCTTTTGCGGTGGC

```
                    EcoRV                                                  HpaII
4921  GCTGGCATCATAGATATCCAGATTTTCACGTGCTGTACGCTGTGCTGATGCCCCGGCAGT

                                          HinPI
4981  TTTAATTTCGCTGAGGTTATTTTTTATCAGCAGCGCGTTATTGCTCATAATGGCTTTAAT

                                    HpaII       HpaII
5041  GGACAGTGCAAGCTGGTTTAATTTTGTTTTATCCGGTTGAATACCGGCTTCTTCCAGCGT
                                                Sau96I
                                              HpaII
                          SspI                HaeIII
5101  GTTTAATAACTCCGCCTGCACAATATTAAACCAGTCCATGCCGGGCCATGTGATAACATT

5161  ATTCCCGTCACCTTCTGAAAACCAGCGAACGATAGCACTACGCTGGGCGGATACGGGCGC

5221  CATGACGGTTACGCCGCTGTCGTTATCAATATAAAACATTAGTTATCTCCGTCATGGTAA

                          HinPI                                    HinPI
5281  ACAAATTTATAAATCTGATGCGCGGGTTTATATTTCTCCAGTAAACATTCCAGCGCACCC

5341  GATTCATAAACACGTAACGGCGTCAGAACATTATCCAGCACCGTTGCGTTGCGATAATTT

                    SspI                      HaeIII
5401  TTAATACCGTAAATATTGACCTGCGTAACCCACTGGCCTTCTGTGGAATCCGTCAGCCTC

                        HinPI                       HinPI              HpaII
5461  ACGGTAAAACCGTACTGCGCAGCCAGCCATTCATAAAAGCGCCGACTCAGATTGCCGGTC

5521  ATACGCATTTTATTCGCGGCAGCCCGCTGGCGTTCGGACAGGGTGCCGTTTTCGCTGGTA

          HpaII
5581  CAGTCCGGCAACCCCAGAAATGATTCCCACTCCCCCAGATACCAGCGGGATGTGGACGGC

                              HinPI
5641  AAACGCTCCCGCAGCATTTGCCGCGCATCATCCGC
```

6. Diskussion

Die Inversionsstelle besteht aus zwei Komponenten

Die sequenzspezifische Rekombinationsfunktion Gin katalysiert die Inversion des G Segments des Bakteriophagen Mu. Die Gesamtheit der DNA Bereiche, die die Inversion des G Segments beeinflussen, wurden zur Inversionsstelle zusammengefaßt. Die Inversionsstelle besteht aus den beiden gegenläufigen Sequenzwiederholungen ('inverted repeats', 'IRs'), die das G Segment flankieren, und einem DNA Segment in der β-Region, das die Inversion des G Segments stimuliert.
Die 'inverted repeats' erfüllen bei der Inversion des G Segments zwei Funktionen. Aufgrund ihrer homologen Sequenz erlauben die 'inverted repeats' die Ausbildung eines DNA-DNA Komplexes, wie er für die 'core-region' in der Anheftungsstelle des Phagen Lambda diskutiert wird (Nash, 1981). Aus diesem Komplex heraus kann dann die sequenzspezifische Rekombinationsfunktion Gin in der Crossing over Stelle, die im IR enthalten ist, die Trennungs- und Ligierungsreaktion ausführen (Schmucker et al., 1986; Iida & Hiestand-Nauer, 1986).

Die vollständige IR Sequenz von Mu ist ausreichend

Es konnte gezeigt werden, daß die IR Sequenz effizient mit einem zweiten IR rekombinieren kann, der noch von G und β flankiert wird. Aufbauend auf dem Ergebnis, daß am α -G Übergang keine flankierenden Sequenzen notwendig sind,

konnte ein BglII Fragment aus Adenovirus getestet werden, das zufällig die äußeren 14bp der IR Sequenz enthielt. Selbst in den sensitiven galK Testplasmiden konnte zwischen dem halben IR und einem kompletten IR keine Rekombination nachgewiesen werden. Da zwischen der halben IR Sequenz und dem kompletten Mu IR keine Basenaustausche vorhanden waren, die eine Ausbildung des DNA-DNA Komplexes behindern könnten, und da die halbe IR Sequenz die Crossing over Stelle enthielt, mußte der Verlust der Rekombinationsfähigkeit auf das Fehlen der inneren Hälfte der IR Sequenz zurückzuführen sein. Auch Johnson & Simon (1985), stellten für das hin System fest, daß nicht die 14bp großen IRs ausreichten, sondern daß zusätzlich die außerhalb des IRs angrenzenden 12bp benötigt werden, um eine effiziente Inversion des H Segments zu ermöglichen. Dies zeigte, daß die Rekombinationsstellen der Inversionssysteme ähnliche Längen besitzen, die zwischen 26bp für das hin System und 34bp bzw. 36bp für das gin bzw. cin System betragen, obwohl die IRs unterschiedliche Längen besitzen (Pl: 640bp, Mu: 34bp, S.typhimurium: 14bp). Sie liegen in der gleichen Größenordnung wie die Rekombinationsstellen anderer sequenzspezifischer Rekombinationssysteme. So besitzen die IRS Stellen in den res Stellen der Cointegrate von Tn3 eine Länge von 19bp. Die 'core-region' im Integrations- und Excisionssystem des Bakteriophagen Lambda hat zwar nur eine Länge von 15bp, jedoch konnte an attB gezeigt werden, daß flankierende Sequenzen notwendig sind, so daß sich die Rekombinationsstelle auf 23bp vergrößert (Mizuuchi & Mizuuchi, 1985). DNA Seg-

mente dieser Größenordnung sind fähig mit Proteinen eine Wechselwirkung einzugehen.

Der Enhancer hat keinen Einfluß auf die Präferenz Inversion - Deletion

Die Orientierung der homologen Sequenzen spielt beim Ergebnis der Rekombination eine entscheidende Rolle. In den Inversionssystemen besitzen sie entgegengesetzte Orientierung, während bei gleicher Orientierung wie z.B. bei den Cointegraten bei Tn3, Deletionen katalysiert werden. Mehrere sequenzspezifische Rekombinationssysteme wurden auf ihre Rekombinationsfähigkeit geprüft, wenn eine der homologen Sequenzen invertiert wurde. Das Integrations- und Excisionssystem des Bakteriophagen Lambda kann Inversionen katalysieren, wenn eine der Prophagenanheftungsstellen invertiert wird (Mizuuchi et al., 1980). Dagegen kann die Resolvase der Tn3 Familie zwischen zwei entgegengesetzt orientierten res Stellen keine Inversion katalysieren (Reed, 1981). Bei den Inversionssystemen entstehen durch die Änderung der Orientierung eines der beiden 'inverted repeats' Rekombinationsstellen mit gleicher Orientierung, die zur Deletion des von ihnen eingeschlossenen DNA Segments führen sollten. Plasterk et al. (1983a) zeigte, daß die Gin-abhängige sequenzspezifische Rekombination zwischen IRs in gleicher Orientierung weniger effizient war, als die Rekombination zwischen entgegengesetzt angeordneten IRs. Es wäre denkbar gewesen, daß der Enhancer bei der Präferenz der Inversion gegenüber der Deletion eine Rolle spielt.

Bei der Klonierung von DNA Fragmenten, die einen IR enthielten, in ein Plasmid, das bereits einen IR enthielt, waren auch Plasmide entstanden, in denen die IRs in gleicher Orientierung vorlagen (z.B. pIR304, pIR809). Die Restriktionsenzymanalyse dieser Plasmide, die den Enhancer enthielten, erbrachte keinen Hinweis auf Deletionen (siehe Bild Nr.13) und bestätigten das Ergebnis von Plasterk et al. (1983a). Beim Inversionstest in den galK Plasmiden konnten Deletionén in Plasmiden nachgewiesen werden, in denen die Enhancerwirkung beeinträchtigt war. Ein quantitatives Maß für die Häufigkeit von Inversion und Deletion in solch einem Plasmid wurde durch zwei Plasmide erhalten, die sich nur in der Orientierung eines IRs unterschieden. In dem Plasmid, in dem die IRs in antiparalleler Orientierung vorlagen, hatte in 25% der Plasmide Inversion stattgefunden. Dagegen fanden in dem Plasmid, das die IRs in gleicher Orientierung besaß, unter den gleichen Bedingungen nur 1% Deletionen statt. In der inv$^-$ Mutante wurde somit eine um Faktor 25 geringere Effizienz der Deletion gegenüber der Inversion gefunden. Die Beeinträchtigung des Enhancers scheint daher keine Auswirkung auf die Präferenz der Inversion gegenüber der Deletion zu haben.

Gin erkennt die IRs zufallsmäßig

Ein weiterer Aspekt des Inversionssystems konnte durch die Charakterisierung des Inversionsverhaltens eines Plasmids beleuchtet werden, das 3 IRs enthielt. In diesem Plasmid befanden sich zwei hintereinander angeordnete IRs in

Tandem Orientierung, während der dritte IR, in einem größeren Abstand liegend, die entgegengesetzte Orientierung aufwies. Aus der Intensität der entstandenen Inversionsbanden konnte geschlossen werden, daß alle möglichen Rekombinationsvorgänge zwischen den beiden möglichen Paarungen von entgegengesetzt orientierten 'inverted repeats' mit der gleichen Effizienz abgelaufen waren. Dies bedeutete, daß Gin weniger in einer gerichteten Bewegung die IRs erkannte und die Inversion katalysierte, weil dann einer der beiden in Tandem Orientierung vorliegenden IRs hätte bevorzugt rekombinieren müssen, sondern daß Gin eher zufallsbedingt die beiden in antiparalleler Orientierung vorliegenden IRs erkannte.

Die zweite Komponente der Inversionsstelle ist ein Enhancer Element

Durch eine sequenzspezifische Mutagenese konnte in der ß-Region ein Bereich identifiziert werden, der die Inversion des G Segments stimuliert. Diese stimulierenden Sequenzen konnten vom G Segment durch die Insertion des 1200bp großen Kan Fragments getrennt werden (in Mu-201), ohne ihre Aktivität zu verlieren. Sie saßen innerhalb eines AhaIII Fragments, das auch in invertierter Form (in Mu-1317) die Inversion des G Segments stimulieren konnte.
Diese Distanz- und Orientierungsunabhängigkeit wurde zuvor schon bei Sequenzen gefunden, die die Transcription in Eucaryonten stimulieren oder repremieren. Sie wurden unter dem Begriff Enhancer Elemente zusammengefaßt (Khoury & Gruss,

1983; Gluzman, 1985).

Die Zusammensetzung der Inversionsstelle aus 'inverted repeat' und rekombinatorischem Enhancer wurde für das G Segment, unabhängig von mir, von Kahmann et al. (1985) und auch für das H Segment von Salmonella typhimurium (Johnson & Simon, 1985) und das C Segment des Bakteriophagen P1 (Huber et al., 1985) gefunden und steht im Gegensatz zu den anderen sequenzspezifischen Rekombinationsvorgängen, der Integration bzw. Excision des Phagen Lambda und der Cointegrat Auflösung bei den Transposons der Tn3 Familie, bei denen bisher keine rekombinatorischen Enhancer gefunden wurden.

Der Enhancer bewirkt eine Stimulierung der Inversion um Faktor 100-1000

Der Grad der Stimulierung durch das Enhancer Element konnte an Hand der Mutanten festgestellt werden. Die Substitutionsmutanten, die im vorderen Bereich der β -Region (Mu-631, Mu-109, Mu-310) lagen, zeigten eine 100-1000 fache Reduzierung der Inversionsrate gegenüber einer Substitutionsmutante im hinteren Bereich der β-Region und standen im Gegensatz zu der von den anderen Gruppen gefundenen Reduzierung der Inversion (Faktor 20). Da Mu-631 aufgrund der 6bp hinter dem IR beginnenden 400bp großen TaqI Deletion keine stimulierenden Sequenzen mehr enthalten konnte, zeigte die mit dieser Mutante erreichte Inversionsrate den Anteil an Inversion an, der ohne Enhancer möglich war. Auch die Insertionsmutanten zeigten eine Reduzierung der Inversionsrate, teilweise um das tausendfache, jedoch waren diese

Werte starken Schwankungen unterlegen. Da diese Schwankungen bei den Kontroll-Lysaten nicht festgestellt wurden, wurde dieses Ergebnis dadurch erklärt, daß in den betroffenen Lysaten die Inversion von G(+) nach G(-) behindert war. Inversion zu einem späten Zeitpunkt der Wachstumsphase würde weniger Lysogene mit G(-) Prophagen liefern als bei einer Inversion zu einer frühen Phase. Dementsprechend würden nach der Induktion und lytischen Vermehrung mehr oder weniger G(-) Phagen im Lysat erscheinen.

Der Enhancer besteht aus mehreren Domänen

Es wurde keine Insertionsmutante gefunden, die die gleiche Reduzierung der Inversionsrate hervorrief, wie die Substitutionsmutanten. Dieses Ergebnis wurde durch die Annahme erklärt, daß mehrere stimulierende Sequenzen am Inversionsvorgang teilnehmen, die in den Sustitutionsmutanten komplett inaktiviert wurden, während in den Insertionsmutanten jeweils nur eine getroffen wurde. Diese Annahme wurde durch den Test von Subfragmenten des stimulierenden DNA Segments erhärtet. Das AhaIII-SspI Fragment (in Mu-1400) erreichte eine Stimulierung der Inversionsrate, die der des AhaIII Fragments (in Mu-1300) entsprach. Die Hauptaktivität mußte somit im AhaIII-SspI Fragment liegen. Für dieses Fragment konnte allerdings eine Orientierungsabhängigkeit festgestellt werden. Die Fähigkeit zur Stimulierung der Inversion sank um Faktor 100-1000, wenn das AhaIII-SspI Fragment in umgekehrter Orientierung vorlag. Da das AhaIII Fragment dieses Phänomen nicht gezeigt hatte, mußte dem AhaIII-SspI

Fragment eine Teilaktivität fehlen. Diese konnte durch Klonierung des SspI-AhaIII Fragments (in Mu-1500) und eines Oligodeoxynukleotids (in Mu-1200) nachgewiesen werden. Für diese Fragmente konnte allerdings keine Orientierungsabhängigkeit gefunden werden. Folglich müssen mindestens zwei Domänen an stimulierenden Sequenzen existieren, die, solange sie im AhaIII Fragment verknüpft sind, orientierungsunabhängig sind, sobald sie jedoch durch SspI getrennt werden, orientierungsabhängig werden. Diese Orientierungsabhängigkeit der Domänen haben Johnson & Simon (1985) auch für den Enhancer des hin Systems gefunden.

Der Enhancer liegt innerhalb eines 210bp DNA Segments

Die Stimulierung durch die Subfragmente des hinteren Bereichs des AhaIII Fragments und die Reduzierung der Inversionsraten in den Mutanten Mu-298, -116 und -279 gegenüber Mu-321 zeigten, daß die hintere Grenze des stimulierenden Bereichs zwischen der HinPI-AhaIII-HinPI Sequenz und der Sau3AI Stelle in Position 1432 liegen mußte. Die vordere Grenze des stimulierenden Bereichs wurde festgelegt durch die 5bp auseinanderliegenden Insertionsmutante Mu-201, in der die Inversion nicht behindert war, und Mu-108, in der eine drastische Reduzierung der Inversionsrate beobachtet werden konnte. Letztere Mutante war vor allem insofern interessant als sie, ebenso wie Mu-201, im Plasmid noch volle Gin Aktivität besaß. Dies erschien plausibel, da die Insertionen außerhalb des gin Gens lagen und weder Promotor noch Shine-Dalgarno Sequenz zerstört wurden.

Sowohl der Faktor der Reduzierung der Inversionsrate, als auch die Grenzen des stimulierenden Bereichs stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen, die von Kahmann et al. (1985) für das G Segment, von Huber et al. (1985) für das C Segment und von Johnson und Simon (1985) für das H Segment gefunden wurden (siehe Bild Nr.26). Dies könnte auf die unterschiedlichen Testbedingungen zurückzuführen sein. Während hier das Inversionsverhalten der Phagenmutanten durch Komplementation von Prophagen, also in vivo studiert wurde, benutzten die anderen Gruppen Plasmide, auf denen die invertierbaren Segmente mit gereinigtem Inversionsenzym auf ihr Inversionsverhalten in vitro überprüft wurden. Da gezeigt wurde, daß ein deutlicher Unterschied bestand zwischen der Komplementierung mit C600, in dem gin in nur einer Kopie vorlag, und dem plasmidkodierten gin, das in 15-20 Kopien vorlag, spielt die Konzentration von Gin offensichtlich eine große Rolle, die die aufgetretenen Unterschiede erklären könnte.

Mögliche Modelle der Enhancerwirkung

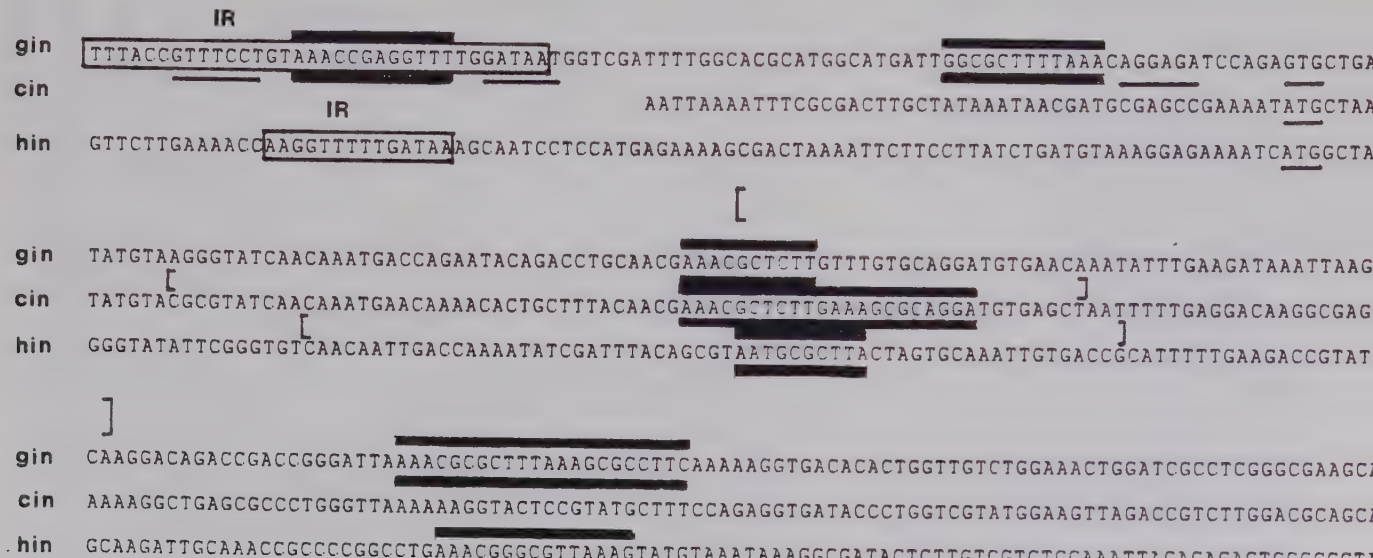
Durch die Insertion des Kan Fragments in die AhaIII Stelle in Mu-108 war die Inversionsrate drastisch gesunken. Daher mußte eine Sequenz getroffen sein, die an der Stimulierung der Inversion beteiligt war. Bei einem Sequenzvergleich stellte sich heraus, daß die AhaIII Stelle Teil einer palindromischen Sequenz war, die noch deutlicher an der zweiten AhaIII Stelle erkennbar war, in die in Mu-116 die Insertion erfolgt war und die ebenfalls eine Reduzierung der Inversionsrate erbracht hatte. Die Sequenz lautete: 5'

AAACGCGCTTT 3'.

Da die Inversionsfunktionen von Mu, Pl, P7 und Salmonella typhimurium untereinender austauschbar sind, wurde angenommen, daß die effiziente Inversion in allen Systemen durch ähnliche Sequenzen hervorgerufen wird. Ein Hauptunterschied in der strukturellen Organisation der Inversionssysteme von Mu und Pl/ P7 ist die unterschiedliche Orientierung von gin und cin bezüglich des invertierbaren Segments. Entsprechend wurde der für die Inversion des C Segments kritische Bereich in invertierter Anordnung 400-600bp entfernt vom IR gefunden (Schmucker et al., 1986). Tatsächlich wurde auch in diesem Bereich des cin Gens die palindromische Sequenz gefunden. Bezüglich der Startcodons von Gin fand sich die palindromische Sequenz allerdings an einer anderen Stelle. Auch im hin Gen wurden Homologien zu der palindromischen Sequenz gefunden. Da die Inversionssysteme aber sehr nahe verwandt sind und daher zwischen den Enzymen eine hohe Sequenzhomologie besteht, könnte es sich bei den Sequenzhomologien auch um eine Konservierung der Proteinstruktur handeln.

Bild Nr.26: Sequenzvergleich des N terminalen Bereichs von Gin, Cin und Hin.

Die Sequenzen wurden nach den Startcodons der Inversionsenzyme ausgerichtet. Die -35- und die -10-Region sowie die Shine-Dalgarno Sequenz von gin (Plasterk et al., 1983b) und die Startcodons sind unterstrichen. Die von Kahmann et al., 1985 für Mu, von Huber et al. (1985) für Pl und von Johnson & Simon (1985) für S.typhimurium veröffentlichten Bereiche der stimulierenden Sequenzen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet. Die palindromische Sequenz ist schwarz eingerahmt. Die Mu Sequenz stammt von Kahmann und Kamp (nicht veröffentlicht), die Pl Sequenz von Hiestand-Nauer & Iida (1983) und die S.typhimurium Sequenz von Zieg & Simon (1980).


IR
gin
TTTACCGTTTCCTGTAAACCGAGGTTTTGGATAATGGTCGATTTTGGCACGCATGGCATGATTGGCGCTTTTAAACAGGAGATCCAGAGTGCTGA
cin
AATTAAAATTTCGCGACTTGCTATAAATAACGATGCGAGCCGAAAATATGCTAA
IR
hin
GTTCTTGAAAACCAAGGTTTTTGATAAAGCAATCCTCCATGAGAAAAGCGACTAAAATTCTTCCTTATCTGATGTAAAGGAGAAAATCATGGCTA
gin
TATGTAAGGGTATCAACAAATGACCAGAATACAGACCTGCAACGAAACGCTCTTGTTTGTGCAGGATGTGAACAAATATTTGAAGATAAATTAAG
cin
TATGTACGCGTATCAACAAATGAACAAAACACTGCTTTACAACGAAACGCTCTTGAAAGCGCAGGATGTGAGCTAATTTTTGAGGACAAGGCGAG
hin
GGGTATATTCGGGTGTCAACAATTGACCAAAATATCGATTTACAGCGTAATGCGCTTACTAGTGCAAATTGTGACCGCATTTTTGAAGACCGTAT
gin
CAAGGACAGACCGACCGGGATTAAAACGCGCTTTAAAGCGCCTTCAAAAAGGTGACACACTGGTTGTCTGGAAACTGGATCGCCTCGGGCGAAGC
cin
AAAAGGCTGAGCGCCCTGGGTTAAAAAAGGTACTCCGTATGCTTTCCAGAGGTGATACCCTGGTCGTATGGAAGTTAGACCGTCTTGGACGCAGC
hin
GCAAGATTGCAAACCGCCCCGGCCTGAAACGGGCGTTAAAGTATGTAAATAAAGGCGATACTCTTGTCGTCTGGAAATTAGACAGACTGGGCCGTA

Kahmann et al., 1985 haben gezeigt, daß zu einer effizienten Inversion ein Wirtsfaktor notwendig ist, der nur dann seine Aktivität entfalten kann, wenn der Bereich mit den stimulierenden Sequenzen vorhanden ist. Für die Inversionsstelle von Mu ergibt sich somit ein Bild, das der Anheftungsstelle des Phagen Lambda (attP) ähnelt. In den Rekombinationsstellen binden die jeweiligen sequenzspezifischen Rekombinationsfunktionen und katalysieren die Rekombination. Ein Wirtsfaktor (bei Int: IHF), der in der flankierenden Region Bindungsstellen besitzt, trägt zu einem effizienten Rekombinationsvorgang bei. In Lambda finden sich in dieser Region noch zusätzliche Bindungsstellen für Int und Xis. Dagegen gibt es für die Existenz solcher Bindungsstellen für Gin noch keinen Hinweis.

Die Modellvorstellungen, die man zur Wirkung eines Enhancers hat, stammen aus den Untersuchungen der eucaryontischen Enhancer Elemente, die man vor allem am Enhancer von SV40 gemacht hat (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981).

Eine Vorstellung baut auf der Erkenntnis auf, daß die meisten charakterisierten DNA Bindungsproteine durch unspezifische Bindung an der DNA bis zur Erkennungssequenz wandern können. Der Bereich der stimulierenden Sequenzen würde folglich als Eintrittsstelle für den Wirtsfaktor und/oder Gin dienen, von wo aus dann die Wanderung zum IR erfolgen würde. Da das Phagengenom aber in linearisierter Form im Bakteriengenom integriert ist, müßte der Enhancer nach diesem Modell, unabhängig von seiner Orientierung, dem Enzym die Richtung zum G Segment angeben, da der Wirtsfaktor und/

oder Gin andernfalls vom integrierten Phagen aus ins Bakteriengenom wandern würde.

Ein anderes Modell postuliert die Ausbildung eines Komplexes aus verschiedenen Proteinen, von denen jedes an seine spezifische Sequenz gebunden ist. Durch die dadurch bewirkte Rückfaltung der DNA kämen sich die vor der Komplexbildung weit auseinanderliegenden Sequenzen sehr nahe. Man könnte sich vorstellen, daß diese Rückfaltung durch eine von vorneherein vorhandene Krümmung in der DNA erleichtert werden würde (Hagerman, 1986). Die Untersuchung des AhaIII Fragments ergab allerdings, daß dieses Fragment keine Krümmung zeigt (Diekmann, pers. Mitteilung). Auch aus einem weiteren Grund scheint dieses Modell für die Inversionssysteme wenig wahrscheinlich. Kanaar et al. (1986) fanden, daß das Mengenverhältnis des Wirtsfaktors zur DNA und nicht zu Gin kritisch ist. Wären beide Proteine an der Komplexbildung beteiligt, hätte man dagegen eine Abhängigkeit der Proteinkonzentration zueinander finden müssen.

Dieses Ergebnis spricht eher für ein drittes Modell, in dem der Wirtsfaktor spezifisch an die DNA bindet und eine Änderung der DNA Topologie verursacht, die sich bis zur Rekombinationsstelle ausbreitet, um dort eine Stimulierung der Inversion zu bewirken. Dadurch wäre die Distanz- und die Orientierungsunabhängigkeit zu erklären, da sich die Topologie-Änderung in beiden Richtungen über das DNA Molekül ausbreiten könnte. Tatsächlich konnte für den Wirtsfaktor eine Topoisomerase-Aktivität nachgewiesen werden (Kanaar et al., 1986; R.Kahmann, pers. Mitteilung).

7. Literatur

R.K.Appleyard (1954) Genetics **39**, 429-439

J.Banerji, S.Rusconi & W.Schaffner (1981) Cell **27**, 299-308

H.C.Birnboim & J.Doly (1979) Nucleic Acids Res. **7**, 1513-1523

F.Bolivar, R.L.Rodriguez, P.J.Greene, M.C.Betlach, H.L.Heynecker H.W.Boyer J.H.Crosa & S.Falkow (1977) Gene 2, 95-113

A.I.Bukhari & L.Ambrosio (1978) Nature **271**, 575-577

A.I.Bukhari & A.L.Taylor (1975) Proc.Natl.Acad.Sci. USA **72**, 4399-4403

L.T.Chow, R.Kahmann & D.Kamp (1977) J.Mol.Biol. **113**, 591-609

N.L.Craig & H.A.Nash (1984) Cell **39**, 707-716

N.S.Cohen, C.Y.A.Chang & L.Hsu (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. **69**, 2110-2114

E.Daniell, J.Abelson, J.S.Kim & N.Davidson (1973) Virology **51**, 237-239

M.Faelen, A.Resibois, & A.Toussaint (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**, 1169-1177

M.Faelen, A.Toussaint, N.Lefedvre, M.Mergeay, J.Braipson-Thiry & G.Thiry (1981a) Arch.Int.Physiol.Biochim. **89**, 55-56

M.Faelen, M.Mergeay, J.Gerits, A.Toussaint & N.Lefedvre (1981b) J.Bacteriol. **146**, 914-919

M.George & A.I.Bukhari (1981) Nature **292**, 175-176

R.Gill, F.Heffron, G.Dougan & S.Falkow (1978) J.Bacteriol. **136**, 742-756

M.Giphart-Gassler & P.van de Putte (1979) Gene **7**, 33-50

Y.Gluzman (1985) Eucaryotic Transcription: The role of cis- and trans-Acting Elements in Initiation (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory)

N.D.F.Grindley (1983) Cell **32**, 3-5

P.J.Hagerman (1986) Nature **321**, 449-450

H.Hartmann und W.Goebel (1977) FEBS Letters **80**, 285-287

F.Heffron (1983) in Shapiro, J.A. ed 1983, Mobile Genetic Elements, New York: Academic, 223-260

J.Herisse, M.Rigolet, S.Dupont de Dinechin & F.Galibert (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 4023-4042

I.Herskowitz & D.Hagen (1980) Ann.Rev.Genet. **14**, 399-445

R.Hiestand-Nauer & S.Iida (1983) EMBO Journal **2**, 1733-1740

M.M.Howe, J.W.Schumm & A.L.Taylor (1979) Virology **92**, 108-124

M.T.Hsu & N.Davidson (1974) Virology **58**, 229-239

P.L.Hsu, W.Ross & A.Landy (1980) Nature **285**, 85-91

H.E.Huber, S.Iida, W.Arber & T.A.Bickle (1985) Proc.Natl. Acad.Sci.USA **82**, 3776-3780

S.Iida, J.Meyer, K.E.Kennedy & W.Arber (1982) EMBO Journal **1**, 1445-1453

S.Iida & R.Hiestand-Nauer (1986) Cell **45**, 71-79

R.C.Johnson & M.I.Simon (1985) Cell **41**, 781-791

R.Kahmann, D.Kamp & D.Zipser (1976) Mol.Gen.Genet. **149**, 323-328

R.Kahmann & D.Kamp (1979) Nature **280**, 247-250

R.Kahmann, F.Rudt, C.Koch & G.Mertens (1985) Cell **41**, 771-780

D.Kamp, R.Kahmann, D.Zipser & R.J.Roberts (1977)

Mol.Gen.Genet. **154**, 231-248

D.Kamp, R.Kahmann, T.R.Zipser, L.T.Broker & L.T.Chow (1978) Nature **271**, 577-580

D.Kamp, L.T.Chow, T.R.Broker, D.Kwoh, D.Zipser & R.Kahmann (1979) Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. **43**, 1159-1167

D.Kamp (1981) Microbiology, 73-76

D.Kamp & R.Kahmann (1981) Mol.Gen.Genet. **148**, 564-566

K.McKennedy, H.Shimatake, D.Court, U.Schmeissner, C.Brady & M.Rosenberg (1981) Gene Amplification and Analysis Vol.II, ed.J.G.Chirikjian & T.S.Papas

G.Khoury & P.Gruss (1983) Cell **33**, 313-314

K.Kutsukake & T.Iino (1980) Nature **284**, 479-481

R.Kostriken, C.Morita & F.Heffron (1981) Proc.Nat.Acad.Sci. USA **78**, 4041-4045

H.J.Lee, E.Ohtsubo, RC.Deonier & N.Davidson (1974) J.Mol.Biol. **89**, 585-597

M.Mandel & A.Higa (1970) J.Mol.Biol.**53**, 159-162

M.G.Marinus & N.R.Morris (1974) J.Mol.Biol. **85**, 309-322

J.Miller (1972) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

K.Mizuuchi, R.Weisberg, L.Enquist, M.Mizuuchi, M.Buraczynska, C.Foeller, P.L.Hsu, W.Ross & A.Landy (1980) Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. **45**, 429-437

M.Mizuuchi & K.Mizuuchi (1985) Nucleic Acids Res. **13**, 1193-1208

P.Moreau, R.Hen, B.Wasylyk, R.Everett, M.P.Gaub & P.Chambon (1981) Nucleic Acids Res. **9**, 6047-6068

H.A.Nash (1981) Ann.Rev.Genet. **15**, 143-167

K.J.O'Day, D.W.Schultz & M.M.Howe (1978) "In Microbiology 1978" (D.Schlessinger ed.) 48-51 ASM Publications Washington D.C.

R.H.A.Plasterk, T.A.M.Ilmer & P.van de Putte (1983a) Virology **127**, 24-36

R.H.A.Plasterk, A.Brinkmann & P.van de Putte (1983b) Proc.Natl.Acad.Sci. USA **80**, 5355-5358

R.R.Reed (1981) Cell **25**, 713-719

R.R.Reed & N.F.Grindley (1981) Cell **25**, 721-728

W.Ritthaler (1983) Diplomarbeit, Fakultät Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München

M.Rosenberg, D.Court, H.Shimatake, C.Brady & D.L.Wulff (1978) Nature **272**, 414-423

W.Ross & A.Landy (1982) Proc.Nat.Acad.Sci.USA **79**, 7724-7728

H.Saedler & P.Starlinger (1967) Mol.Gen.Genet. **100**, 178-189

F.Sanger, A.R.Coulson, G.F.Hong, D.F.Hill & G.B.Petersen (1982) J.Mol.Biol. **162**, 729

R.Schmucker (1984) Diplomarbeit Tübingen

R.Schmucker, W.Ritthaler, B.Stern & D.Kamp (1986) J.Gen.Virology **67**, 1123-1133

W.Schumann & E.G.Bade (1979) Virology **60**, 534-542

M.Simon, J.Zieg, M.Silverman, G.Mandel & R.Doolittle (1980) Science **209**, 1370-1374

M.Silverman & M.I.Simon (1983) in Shapiro, J.A. ed 1983, Mobile Genetic Elements, New York: Academic, 537-557

P.Stougaard & S.Molin (1981) Anal.Biochem. **118**, 191-193

B.Sugden, B.DeTroy, R.J.Roberts & J.Sambrook (1975) Anal.Biochem. **68**, 36-46

J.G.Sutcliffe (1978) Nucleic Acids Research **5**, 2721-2728

A.L.Taylor (1963) Proc.Natl.Acad.Sci.USA **50**, 1043-1051

A.Toussaint, N.Lefebvre, J.Scott, J.A.Cowan, F.De Bruijn & A.I.Bukhari (1978) Virology **89**, 146-161

E.van Leerdam, C.Karreman & P.van de Putte (1982) Virology **123**, 19-28

A.van Meeteren, M.Giphart-Gassler & P.van de Putte (1980) Mol.Gen.Genet. **179**, 185-189

P.van de Putte, M.Giphart-Gassler, N.Goosens, T.Goosens & E.van Leerdam (1980a) Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. **45** 347-353

P.van de Putte, S.Cramer & M.Giphart-Gassler (1980b) Nature **286**, 218-222

J.Vieira & J.Messing (1982) Gene **19**, 259-268

R.G.Wells & N.D.F.Grindley (1984) J.Mol.Biol. **179**, 667-687

S.Yin, W.Bushman & A.Landy (1985) Proc.Nat.Acad.Sci.USA **82**, 1040-1044

T.Yun & D.Vapnek (1977) Virology **77**, 376-385

J.Zieg & M.Simon (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA **77**, 4196-4200

Meine akademischen Lehrer waren:

D.Mecke, G.Weitzel, K.Elsele, H.Probst, U.Weber, A.Wendel,
E.Bayer, M.Hanack, W.Voelter, J.Strähle, W.Zeil, W.Braun,
H.Zähner, V.Braun, H.Wolf, W.Seyffert, H.Metzner, E.Betz,
H.Remmer, K.G.Grell, K.Reutter, G.Staudt, D.Kamp

Lebenslauf

I. Persönliche Daten

- Geboren am 21.4.1955 in Elsenfeld/Main als erstes von drei Kindern der Eheleute Josef Schmucker und Elisabeth Schmucker geb. Fröhlich
- 11.September 81 Eheschließung mit Gabriele Schmucker, geb. Keßler
- 1.Juli 84 Geburt unserer Tochter Sabine

II. Ausbildung und Bundeswehr

- Herbst 61 bis Sommer 65 Besuch der Volksschule in Elsenfeld
- Herbst 65 bis Sommer 74 Besuch des math.nat.Gymnasiums in Erlenbach/Main
- 1.Juli 74 bis 30.Juni 76 Verpflichtung bei der Bundeswehr für 2 Jahre, Dienst bei der ABC-Abwehr in Bruchsal

III.Studium

- seit Oktober 76 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Juli 1977 Vordiplom in den Fächern Anatomie, Botanik, Physik und Zoologie
- Juli 1979 Vordiplom in den Fächern Anorg.Chemie, Organ. Chemie, Physikal.Chemie und Physiolog.Chemie
- April 80 bis März 81 Studienjahr am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München, während dieser Zeit an der Universität München eingeschrieben;
- April 81 Rückkehr an die Universität Tübingen, dort Tätigkeit als hilfswissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Mikrobiologie I, Prof.Dr.Zähner
- Mai/Juni 82 Diplomprüfung an der Universität Tübingen
- Juli 82 bis Januar 84 Anfertigung der Diplomarbeit am MPI für Biochemie in München in der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik unter Anleitung von Herrn Dr.D.Kamp
- Januar 84 bis August 86 Anfertigung der Doktorarbeit in der gleichen Gruppe